DOI:10.16016/j.1000-5404.1986.03.002

从细胞的氧化代谢反应观察烧伤对中性粒细胞杀菌功能的影响

黄文华 吴军正 胡祖祥 钟力华 冯素珍 （第一附属医院 免疫实验室）

黎 鳌 姜坤元 （第一附属医院 烧伤中心）

提 要 烧伤后机体免疫防御系统受到损害，中性粒细胞也同样受到影响，但在抗感染中它占有重要地位，为此，深入了解其在伤后的功能状态很有必要。本实验通过H_2O_2释放和碘化反应两种测定细胞氧化代谢反应方法，观察中性粒细胞的杀菌功能。从呼吸道烧伤犬和烫伤大鼠二个烧伤实验模型中所得初步印象均说明，在伤后第一周内细胞的氧化代谢反应呈现明显的逐渐减弱现象，即杀菌能力受到抑制。另外，更从直接杀伤酵母菌的实验中也得到相同的印象。为了辨明杀菌能力受损的原因，是由于伤后血中出现的抑制因子，还是细胞本身受损，又进一步观察了血清因素的影响。结果伤犬血清对正常中性粒细胞有抑制作用，说明血清抑制因素是存在的。但正常血清不能明显改善伤犬细胞受抑的氧化代谢反应，说明血清因素不是唯一的原因，细胞本身也因烧伤的影响而受到损害。

关键词 烧伤；中性粒细胞；杀菌功能；氧化代谢；血清抑制因子

在烧伤后机体防御系统功能受抑的情况下，作为其组成部份之一的中性粒细胞（PMN）也同样受到影响。由于它处于抗感染第一线，其功能状态在控制烧伤感染中至关重要[1-3]。所以深入探明它在伤后的变化有一定的实际意义。我们以检测细胞的氧化代谢反应，用于观察PMN在实验动物烧伤后细胞内杀菌能力的动态变化，并对血清因素的影响进行了探讨。

实验方法

一、实验动物模型

1. 蒸气呼吸道烧伤及复合体表烧伤犬实验模型：杂种犬在硫苯妥钠轻度麻醉下，经气管插管后通以110℃蒸气3秒钟，气管内最高温度99℃，维持90℃以上时间为3秒，50℃以上为20～27秒。如再复合体表烧伤，则于呼吸道烧伤后，立即在背部以燃烧凝固汽油造成占体表面积30%的Ⅱ°烧伤。由于麻醉较浅，一般于致伤后很快苏醒，于伤后6小时后开始喂食时，大多均能自行进食，拒绝进食者给以基础水份（40ml/kg）。实验动物分为两组：（1）单纯呼吸道烧伤（单呼组）：体重13.01±1.7kg，共15例；（2）呼吸道烧伤复合体表烧伤（复合组）：体重11.8±0.8kg，共10例。均于伤前、伤后6小时、1、2、3、5和7天采集血标本供检测。

2. 大鼠烫伤创面感染实验模型：大白鼠（体重200～250g）在戊巴比妥钠麻醉下，在去除毛发的背部造成占体表面积30%左右的Ⅱ°烫伤（90℃水温12秒）。伤后立即给予腹腔注射生理盐水30ml/kg。伤后2小时内在焦痂上均匀涂布经18小时培养的绿脓杆菌（10^9/ml）。伤后单笼饲养，自由进食。实验分为两组：一为致伤组，另一为对照组，即不烫伤不涂菌，其他处理与致伤组完全相同。两组动物按随机分配，分别于伤后1、4和7天活杀，收集血液以肝素抗凝供分离PMN之用。

二、PMN细胞氧化代谢反应的测定

1. 过氧化氢释放法：基本按照Pick等[4]方法稍加改进。原理是当细胞膜受刺激后，细胞内氧耗增加，产生过氧化氢（H_2O_2），并部份地释放至细胞外。即以测定释放的H_2O_2量表明氧化代谢的增强或减弱。H_2O_2的测定是利用在过氧化物酶的作用下，H_2O_2使酚红氧化发生色泽变化（此时酚红颜色的变化不是由于酸碱度的改变，而是由于被氧

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

化）。在强碱性溶液中呈紫色，色泽的深浅与H_2O_2量成正比。测定的方法是取肝素血，经含NH_4Cl的缓冲液处理以去除RBC后，制成PMN悬液，加给用IgG致敏的胶乳颗粒作为膜刺激剂，再加给酚红、辣根过氧化物酶、叠氮钠、血清、葡萄糖和磷酸盐缓冲盐液配制的试剂，混匀后37℃培育30分钟，离心取上清，加NaOH使之碱化后，在610nm波长记取光密度。以已知浓度经过标定的标准H_2O_2作一系列稀释，按上述方法，但不加给IgG致敏的胶乳颗粒，求得光密度后绘制标准曲线，据此得出待测PMN释放H_2O_2的量，并以H_2O_2nM/5×10^6PMN/30分钟表示结果。

2. 碘化试验：基本按照Pereira等[6]的方法。其原理是：在PMN吞噬过程中，溶酶体中的髓过氧化物酶、氧化代谢反应产生的H_2O_2、再加上卤素离子（如碘），构成一杀菌系统。故从细胞摄入碘量的多少可以测定PMN的氧化代谢功能。测定的方法系用聚蔗糖-泛影脯胺配制的梯度细胞分离液，自肝素血中分出PMN，制成悬液，加给热处理并经洗涤的酵母菌作为被吞噬的异物，一定浓度的^{125}碘（$Na^{125}I$）以供给卤素离子、豚鼠血清等，37℃培育1小时，然后洗去游离的碘，用^{125}I放免测量仪记数被细胞摄入碘的放射活性，根据NaI的浓度，按下式计算10^6PMN摄入的碘量。

$$I\text{（摄入）}(nM/10^6PMN)=\frac{\text{测定管(cpm)}-\text{空白管(cpm)}}{\text{总放射活性管(cpm)}}\times NaI\ (nM/管)$$

三、PMN杀伤酵母菌的测定　基本按照Wood等[6]的方法，但改白色念珠菌为酵母菌。即将培养于沙保罗氏培养基3至5天的酵母菌经洗涤后，用美兰染色法计数死菌数，求得自然死亡率，然后加于自肝素血中分出的一定数目的PMN中，37℃培育1小时后，用去氧胆酸钠破坏细胞，再用美兰染色，计数至少500个细菌，求得死菌百分数。以同样处理但未加PMN的酵母菌作为对照。在扣除自然死亡率后，以测定管减去对照管的死菌率，即为被PMN杀灭的酵母菌百分数。

四、血清因素的观察　在测定H_2O_2释放的试验中，对致伤动物PMN的测定，除用自身血清外，也用正常血清；此外，更取正常动物PMN，分别用致伤动物血清和自身（正常）血清同时测定。目的在于分别观察正常血清对致伤动物PMN和致伤动物血清对正常PMN的影响。

五、统计学处理　所得数据均经统计学处理，以t检验及方差分析，对组内和组间差异的显著性进行分析。

实验结果

一、从H_2O_2的释放观察烧伤对PMN细胞内杀菌能力的影响

实验是在呼吸道烧伤犬中进行的，结果见表1所示。单呼组伤后早期（6小时）PMN的氧化代谢，可能因创伤刺激而一度出现被激活现象，表现在H_2O_2的释放较伤前明显增多（$P<0.05$），约为伤前的130.3%。此后缓慢下降，伤后5和7天时分别为伤前的77.9%和76.0%，显示氧化代谢有明显受抑现象（$P<0.05$）。复合组的变化规律与单呼组相似，但可能由于伤情较重，故早期H_2O_2释放虽也有增多，然而与伤前比较差别尚不够显著。而且伤后受抑现象提早于伤后3天即已明显不同于伤前（$P<0.05$）。5天时继续下降，差别更趋明显（$P<0.01$）。7天时差别仍显著（$P<$

表1　呼吸道烧伤犬伤后中性粒细胞的氧化代谢(H_2O_2释放)

组别	伤前	伤后时间					
		6°	1天	2天	3天	5天	7天
单呼组	27.1±1.8*	35.3±3.2(a)	26.7±2.6	23.0±1.2	22.7±2.2	21.1±1.8(a)	20.6±1.2(a)
复合组	24.7±0.8	30.2±4.6	27.3±2.0	26.6±2.0	20.8±1.2(a)	18.7±1.6(b)	20.7±0.8(a)

*H_2O_2nM/5×10^6PMN/30分钟±SE

t检验：与本组伤前比，P值：(a)<0.05；(b)<0.01

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

0.05）。单呼与复合两组间虽有上述不同之处，但总的变化趋势一致，表现在两组间相互比较（方差分析）无统计学差异。

二、从碘化反应观察烧伤对 PMN 细胞内杀菌功能的影响

从大鼠烫伤和创面感染的实验中，也同样看到伤后PMN氧化代谢反应受抑现象（见表 2）。伤后第一天致伤组与对照组动物PMN的碘化反应能力尚无显著差别。但伤后 4 和 7 天时，致伤动物摄入碘的能力明显受抑，与对照组相比 P 值分别为<0.01和<0.001。

表 2　烫伤大鼠伤后中性粒细胞的氧化代谢(碘化反应)

组　别	伤后时间		
	1 天	4 天	7 天
对照组	0.18±0.02*(9)**	0.21±0.03(8)	0.31±0.02(12)
致伤组	0.19±0.04(13)	0.11±0.02(10)	0.12±0.02(11)
t 检验P值	NS	<0.01	<0.001

*I(摄入)nM/10^9PMN±SE

**括号内为例数

三、烧伤后 PMN杀灭酵母菌能力的观察

为了配合上述从氧化代谢反应观察 PMN 杀菌功能的实验，在呼吸道烧伤犬还直接观测了 PMN杀灭酵母菌能力的变化。从图 1 同样可以看到被 PMN杀灭的死菌百分数呈现逐渐下降趋势，也同样表现出在单呼组和复合组间无明显差别。显示与上述氧化代谢反应的一致性。

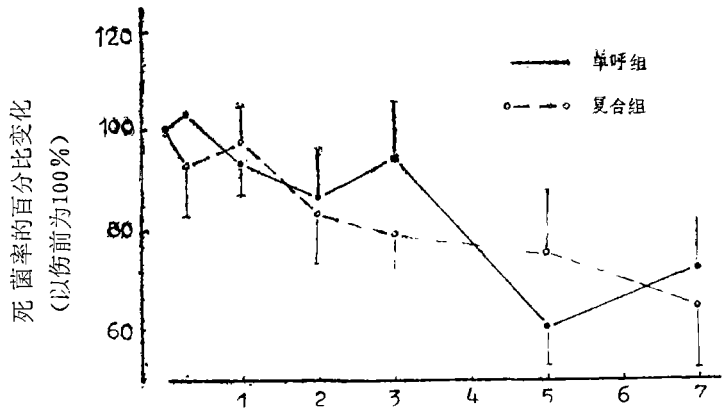


图 1　呼吸道烧伤犬PMN杀伤酵母菌能力的变化

•——•单呼组　　◦———◦ 复合组

四、血清因素对 PMN 杀菌功能的影响

关于血清因素的影响是在测定烧伤犬PMN释放H_2O_2的同时，分别对正常血清能否改善伤犬PMN的变化，以及伤犬血清是否对正常PMN产生影响，两方面进行探讨的。从表 3 中可见正常犬的PMN在自家（正常）血清的存在下，释放H_2O_2的量比较恒定。而伤犬血清对正常PMN的H_2O_2释放却有抑制作用。尤其是在伤情较重的复合组作用更为明显，自伤后早期（6 小时）已显著不同于正常血清（P<0.01）；直至伤后 5 天抑制作用仍明显存在；即或至观察终止时（7 天），虽P 值不够显著水平，但也仍有别于

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

表 3　不同血清对正常犬PMN释放H_2O_2的影响

血清来源	伤后时间					
	6°	1天	2天	3天	5天	天7
单呼组伤犬	33.0±6.9*	21.6±1.9	19.4±1.1(a)	18.8±1.6	18.8±2.7(a)	20.2±2.0
正常犬	25.6±1.4	27.6±2.1	23.2±1.2	21.4±2.4	25.8±1.1	23.6±1.1
复合组伤犬	17.6±1.0(b)	19.4±1.6	18.0±1.7(a)	17.8±0.7(c)	17.4±1.4(a)	20.0±1.4
正常犬	22.4±0.8	23.2±2.2	25.0±1.6	24.8±1.3	22.2±1.3	23.2±1.3

*H_2O_2nM/5×10⁶PMN/30分钟±SE

t 检验，同一时相内不同血清相比　P值：(a)<0.05；(b)<0.01；(c)<0.001

正常血清。单呼组可能伤势较轻，故其血清的抑制作用也较复合组为弱，而且迟至伤后第二天其抑制作用方使 H_2O_2 的释放显著低于正常血清。另一方面，对比表 4 中的伤犬

表 4　不同血清对呼吸道烧伤犬PMN释放H_2O_2的影响

血清来源	伤后时间					
	6°	1天	2天	3天	5天	7天
单呼组伤犬	35.3±3.2*	26.7±2.6	23.0±1.2	22.7±2.2	21.1±1.8	20.6±1.2
正常犬	54.4±13.6	35.0±5.3	22.0±1.4	24.8±2.3	21.1±1.2	21.4±1.6
复合组伤犬	30.2±4.6	27.3±2.0	26.6±2.0	20.8±1.2	18.7±1.6	20.7±0.8
正常犬	24.8±2.9	33.4±3.5	26.8±3.6	18.8±2.2	20.6±1.6	19.0±1.3

*H_2O_2nM/5×10⁶PMN/30分钟±SE

血清与正常血清对伤犬PMN的H_2O_2释放，后者虽使之稍有增多，但改善甚微，无统计学意义。说明正常血清不能改变烧伤对PMN所产生的影响。再者，从大鼠烫伤后碘化反应渐趋减弱也可以看到是烧伤导致 PMN 本身受损的结果。因为碘化试验中的 PMN 是经过分离和洗涤，已排除了自家血清的存在。

讨　论

中性粒细胞对被吞噬细菌的杀灭可分为二个系统，一是依赖氧，另一是不依赖氧。占主要地位的是前者，其杀菌过程大致如下：即当 PMN 胞膜受到刺激时（如吞噬细菌），可导致细胞内氧化代谢反应增强，氧耗增加，同时产生一系列氧的还原产物如：单线态氧（Singlet Oxygen，$^1O_2^{\cdot}$）、超氧阴离子（Super Oxide，O），此物不稳定，可自行或通过超氧化物歧化酶的作用还原成过氧化氢（H_2O_2），后者又可生成氢氧自由基（OH），这些氧的还原产物均具有杀菌能力（见图 2）。其中以 H_2O_2 最为重要，一是比较稳定，再者不仅本身具有杀菌作用，而且在有卤素离子（如 I，Cl）存在

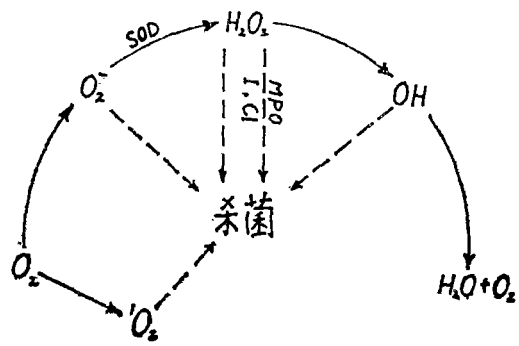


图 2　PMN氧化代谢反应的一系列氧还原产物
MPO(髓过氧化物酶)
SOD(超氧化物歧化酶)

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

时，参与髓过氧化物酶（MPO）的杀菌作用，使被吞噬的细菌碘化而杀灭之[7]。本文所采用测定PMN氧化代谢的二种方法：一是测定PMN在吞噬杀菌过程中释放的H_2O_2。由于H_2O_2除在细胞内的吞噬溶酶体（phagolysosome，由被吞异物和溶酶体互相融合而成）内杀伤细菌外，部份地被释放至细胞外（约10～15%），测定此被释放的H_2O_2量可以说明细胞的杀菌活性。虽然酚红氧化法敏感性较差，但从测得的结果来看，仍显示出中性粒细胞杀菌功能在伤后有所下降。另一是利用同位素^{125}I测定PMN在吞噬杀菌过程中摄入的碘量，即通过在MPO作用下的碘化反应观察细胞的杀菌能力。我们借助于这二个不同的测定方法，在二个不同的实验性烧伤模型中，都显示中性粒细胞依赖氧的杀菌能力在伤后第1周内呈现逐渐减弱现象。从细胞直接杀灭酵母菌的实验也证实杀菌能力确实降低了。这都说明烧伤使PMN的杀菌能力受抑。不少作者对这一论点也是持肯定意见的[2,8]。最近Allen等[3]曾以化学发光法（Chemiluminescence）观测到烧伤面积＞40%的患者较正常人以及烧伤面积＜40%者的氧化代谢活性偏低。再者，呼吸道烧伤犬实验中的单呼组和复合组，伤情虽有轻重，但PMN氧化代谢反应受抑制的情况两组间无明显差别，只是程度上稍有不同而已。说明烧伤后杀菌能力受抑较甚，既或伤情较轻者也同样受害。

关于血清抑制因子的存在与否、来源于何处、其理化特性等问题，目前意见尚未统一[9-11]。从本实验的结果看，伤犬血清能抑制正常PMN的杀菌能力，且与伤情轻重有一定关系，说明血清因素是存在的。但正常血清对改善伤犬PMN受抑的氧化代谢反应其作用甚微。而且经过分离和洗涤，去除了自身血清的烫伤大鼠其PNM的碘化反应在伤后仍呈现受抑现象。这都说明导致烧伤后PMN杀菌能力减弱，血清抑制因子虽是原因之一，但不是唯一的原因（除血清因子外，尚有抑制性T细胞的作用，本文未涉及）。看来PMN本身受烧伤影响而发生改变也是存在的。Donati等[12]也有与我们的意见相同的报导。据此当考虑改善PMN的功能时，应顾及细胞本身受损与血清抑制因素这两方面。

参考文献

1 Alexander JW, et al. A sequential prospective analysis of immunologic abnormalities and infection following severe thermal injury. Ann Surg 1978; 188:809

2. Ransjö V, et al. Some aspects of neutrophil granulocyte function in burn patients. Burns 1979; 5:255

3. Allen RC, et al. Humoral-Phagocyte axis of immune defense in burn patients. Arch Surg 1982; 117:133

4. Pick E, et al. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. J Immunol methods 1980; 38:161

5. Pereira HA, et al. Neutrophil iodination micro-method as an index of neutrophil and opsonic function. J Clin Lab Immunol 1983; 11:47

6. Wood SM, et al. A micromethod for the estimation of killing and phagocytosis of Candida albicans by human leukocytes. J Immunol methods 1978; 20:43

7. Stinnett, JD. Normal resistance to infection. In Stinnett "Nutrition and the immune response". CRC Press Inc Boca Raton Florida 1983; P. 12～16

8. Grogan JB. Altered neutrophil phagocytic function in burn patients. J Trauma

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

1976; 16:734

9. Ninnemann JL, et al. Definition of a burn injury-induced immunosuppresive serum component. In "Abstract of the 16th Annual Meeting of Am Burn Association". Apr 11~14 1984, Abstr. No. 1

10. Fikrig SM, et al. Neutrophil chemotaxis in patients with burns. Ann Surg 1977; 186:747

11. Venge P, et al. Locomotion of neutrophil granulocytes from patients with thermal injury. Identification of serumderived inhibitors. Burns 1981; 8:6

12. Donati L, et al. Preliminary clinical experinces with the use of immunomodulators in burns. J Trauma 1983; 23:816

Evaluation of the Influence of Thermal Injury on Bactericidal Capacity of Neutrophils through Studies on Changes of Cell Oxidative Metabolism

Huang Wenhua, et al

(Laboratory of Immunology, First Teaching Hospital, Third Military Medical College)

Body defence functions are seriously impaired after thermal injury. Neutrophils, the important phagocytic cells against bacterial invasion, are also affected. Therefore it is of value to study the functional statue of these cells in the postburn course. Two assays to observe the bactericidal function of neutrophils were adopted: the determination of the amount of H_2O_2 released and the ^{126}I taken by the activated neutrophils in oxidative metabolic processes. The results of the experiments on 2 animal models, inhalation injured dogs and scalded rats (TBSA 30% of third degree burns) with pseudomonas infection, showed that the cell oxidative metabolic response of the neutrophils was severely depressed in the first week postburn, indicating the presence of profound inhibition of the bactericidal function of the cells after thermal injury. In order to verify these results, direct yeast-killing assay was carried out and similar results were obtained.

In order to explore the cause of the suppression of the bactericidal function, whether it was due to the presence of suppressive factors in the blood of burn victims, or due to the direct detrimental effect of thermal injury on the cells, further experiments to observe the crossed effects of burned serum on normal cells and normal serum on burned cells were performed. It was demonstrated that serum suppressive factors were present and the direct effects from thermal injury also played a part in suppressing the function.

Key words: Thermal injury; Neutrophil; Bactericidal function; Oxidative metabolism; Serum suppressive factors

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