DOI:10.16016/j.1000-5404.1982.04.010

重度呼吸道蒸汽烧伤犬，左心室血浆过敏毒素（AT）动态的初步观测

微生物学教研室 周善章 艾亿龄

摘 要

为探讨烧伤后肺水肿和肺功不全的始动机制，以呼吸道蒸汽烧伤犬为模型，用Elisa法测左心室血浆AT动态，并观测与AT有因果关系的指标。综合Hugli(1976,1978)和Beebe (1980) 的方法提取犬血清AT抗原，其圆盘电泳单一区带的动度为+1.9—2.1mm/l'；聚焦电泳I.p≈8.1；SDS 电泳法分子量在9000左右；4.3ug即可使伊文思兰皮肤渗出试验和兔PMN趋化试验阳性。本组动物的初步结果：(1)AT，伤前，32.05±23.11u/ml，N=14；烧后60'，61.43±41.13；120'，61.14±24.69；240'，75.75±38.44；均高于伤前，$p<0.05$。组间比较，在60'—120'期间才高于对照，$p<0.02$。(2)伤后4小时肺血管和气管周的肥大细胞脱粒%，为60—94%，高于对照，$p<0.001$，(3)组织胺。左心血伤前，109.6±26.3ng/ml，伤后要到240'（132.9±17.4）才高于对照（86.5±12.8），$p<0.05$。右心血无差异。伤后120'肺匀浆，5.72±0.84ug/gm；较对照明显偏高，$p<0.05$。(4)伤后240'肺水量（81.76±1.27%总重）高于对照（79.60±0.95%），$p<0.01$。(5) PaO_2，$PaCO_2$，和BEb值均下降，血pH却升高。

同实验条件另组动物的结果：(1) PEG法测得30'左心血清浊度OD_{450}：0.094±0.019，高于对照。(2)30'左心血清总补体284±25CH50/ml。(3)40'左心血内PMN吞噬百分，13.9±6.5%。(4)烧后4小时肺匀浆PgE_1：37.8±2.8pg/gm。(1)、(3)测值均高于对照，$p<0.05$；(2)、(4)则较对照为低

初步认为：烧后左心血浆AT在伤后60'以后明显升高，烧伤是主要的原因，与血内出现聚合蛋白有关；AT可能通过肥大细胞，组织胺，PgE_1而间接地起作用；AT直接或（和）间接地作用内皮、上皮细胞和平滑肌，并导致血管通透性增加，气道变窄阻塞，引起ARDS；招引PMN并降低其吞噬活性，导致炎症和感染。

大面积烧伤早期常常并发急性呼吸综合症（ARDS），发病率约22%，病死率高达84%；病情轻重与在室内烧伤病史有关[1]。并发的原因，除气道阻塞外，肺水肿也很重要，已由呼吸道蒸汽烧伤的动物模型证实，都认为这种肺水肿的直接起因是毛细血管的通透性增高[2][3]。曾经认为肺间质血管通透性增高，主要是烧伤后的血内出现所谓的“烧伤毒素”。它是一种小分子肽，直接作用于内皮细胞并使血管通透性增加，还损害心肌[4][5]。

不少文献记载，大面积烧伤后血内备解素、C_3和总补体均明显下降[6][7][8]。活化后的补体，经静脉注射或喷入气道，也能引起肺水肿[9]。因此想到，活化补体成份中的过敏毒素（AT：Anaphylatoxin），来源于C_3和C_5并与备解素的活动有关，属于小分子肽，能使血管通透性增加、平滑肌收缩和粘液腺分泌转旺[10]；它可能就是上述的“烧伤毒素”，或者只是其中的一个组份。

为了证实呼吸道烧伤后的血内是否确有AT出现，探讨它在肺水肿和ARDS的发生中有无作用，以呼吸道蒸汽烧伤犬为模型，自提犬血清过敏毒素，用Elisa法测定模型犬左心室血浆AT的动态。结合与AT有因果关系的一些指标，进行综合分析，初步的结论是：确有AT水平在烧后一小时开始明显上升的现象；AT是烧后肺水肿和ARDS的始动因素之一。

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

材 料 和 方 法

一、动物模型

成年雄犬24只分为两组：烧伤组14只，体重12.4±1.66kg，静脉注射戊基巴比妥钠29.3±4.3mg；对照犬10只，体重12.4±2.16kg，其戊基巴比妥钠用量为31.3±3.1mg。10～15%硫钠脱去腹毛。经股动脉插入8号塑料导管至左心室内，并由此输入肝素生理盐水（8.3mg/ml）150—200ml。静脉注射司可林控制呼吸后，经气道插管通蒸汽约1000ml，压力0.42kg/cm^2，气温110℃。热电偶测得气管内温度高达99.7±0.64℃，90℃以上温度持续6秒，50℃以上持续28.7±2.87秒钟。对照组的实验条件与上相同，只是不烧伤。

经心导管采取血标本，时间是烧伤前（距准备处理已一小时），烧后5′、30′、60′、120′、和240′。每次采10—40ml，随即补给相同量的犬血，但未经交义配型。烧后240′采血后活杀实验犬，切取同一部位的肺组织做病解和其它的检查。

二、血清AT提取和血浆AT的Elisa检测方法

（一）AT提纯、特性测定及其抗血清制备

基本上是综合Hugli（*1975, 1978*），和Beebe（*1980*）的方法进行的[11][12][13]，概述如下。

采犬血250ml，凝固后立即剥离并放37℃水箱1小时。4℃，7000rpm（r=15.5cm）离心30′，分得血清约100ml，随即加入166ml的1.5%菊醣悬液（0.15M，pH7.4奴弗拿缓冲液配制，含$CaCl_2$ 0.003%，$Mgcl_2$ 0.017%）。17℃水浴内搅30′后加氨基乙酸（EACA）35克，置37℃水浴搅拌60′。加PEG—6000，20g/100 ml，转至25℃水浴内搅动15′。4℃，5400rpm（r=15.5cm）离心15′，吸取得上清约250ml。

以10 N NaoH调上清pH到7.4，加无离子水至上清电导为1500uv/cm，然后上DEAE-11纤维素滤杯（2#玻沙滤器直径10cm，纤维素层高约2cm）。重复滤二遍后留下滤液备用。用1NHCl调滤液至pH5.0，酌加0.5M甲酸氨使电导升至2200uv/cm，然后过CM-32纤维素滤杯（4#玻沙滤器直接4cm，纤维素层高约6cm）。重复滤二遍后，弃去滤液。以pH5.0，7700uv/cm的甲酸氨将杯内CM-32吸附层洗净，至无泡沫洗下为止。换用pH5.0，29000uv/cm的甲酸氨进行洗脱，每管收洗脱液3ml，至无泡沫洗下为止。

测定每管洗脱液的OD_{280}、OD_{267}和电导的数值，并绘制曲线。选出位于OD_{280}高峰内、其电导又在24000—28000之间的各管，然后测每管洗脱液对兔白细胞的趋化作用，用琼脂醣凝胶层下游动法进行[14]。纯AT一般位于26000uv/cm又趋化阳性的洗脱管中。

抽出趋化阳性各管做聚丙酰氨园盘电泳[15]，条件为pH4.3、电导800uv/cm和8mA/管。区带只有一条，电动度为+1.9－2.1mm/1′。聚焦电泳[16]测得纯品AT的等电点在pH8.1左右。SDS电泳[17]，以胰岛素和溶菌酶为志标，测得纯AT分子量约为9000。在伊文思兰家兔皮肤通透性试验中[18]，纯品AT3.4ug经皮内注射20′后，染料明显在注射部位渗出；甲酸氨洗脱液无此作用。如发现制品不纯，可再过一次CM-32，或加等量无水乙醇再过CM-32，即可解决[12]。根据所测的理化和生物学作用的初步结果，所提取的AT近似人的C_3a[10]。

根据纯化AT管的OD_{267}测值和C_3a的消化系数（$E^{1\%}_{267}$=6.38）[10]算出AT浓度（ug/ml）。

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

记下总体积后冰冻干燥之，加少量无离子水使浓度＞2000ug/ml。将AT40ug（0.2ml）加等量弗氏完全佐剂，充分混匀后注入一只雄兔的足垫内和趾缝间。数日后腘窝淋巴结肿胀，再注射10ug（0.05ml）AT于淋巴结内。一周后肌肉注射AT40ug，10天后用双向琼脂凝胶扩散沉淀反应试血。如果不释稀的抗血清与AT抗原出现肉眼可见的单一沉淀线，与正常犬血清无反应，即可放血。灭活后在-20℃冻固保存。

（二）待检标本的事先处理和Elisa测定方法

用常规的EDTA抗凝管采血2ml，摇匀后立即放4℃保存。4小时内离心分离血浆封入无菌安瓿内，放-40℃冻固保存，待全部144份标本收备后，两次测定完毕。

临测定前加钨酸钠蛋白沉淀液4份，以去除无关杂蛋白，以利AT在塑料板上包被。曾经用纯品AT加正常犬血浆予试，以加钨酸钠4份较为合宜。

用间接ELisa法测定AT[19]。标本中AT直接包被在塑料板凹内；第一抗体是兔抗犬AT血清，经盒子滴定其工作浓度为1:150；辣根氧化酶标记抗体是羊抗兔IgG的血清，其工作浓度为1:600。正式试验的程序、加量和条件与一般的Elisa法相同；用来调零点的板凹内的加料也与上相同，只不加第一抗体血清。拿纯品AT加正常犬血浆作已知标本，测绘标准曲线，定OD490＝0.2的凹内AT含量为一个AT暂定单位。拿一份正常犬血浆重复测40次，计算变异系数(CV)。

三、其它配合指标的观测方法

在心血内测定的有：聚合蛋白和（或）免疫复合物，总补体含量，组织胺，5HT，嗜中性粒细胞吞噬活性。在肺组织内观测的有：肥大细胞脱粒百分率，pgE_1含量和肺水含量。方法均见各协作组的专题报告中；其结果将在本文的讨论中引述。

结　　果

正常犬外周静脉血浆AT含量和测量误差。常规法采正常犬静脉血一份，经40次重复测定，其AT值为22.32±1.59u/ml；CV＝8%。因系同份标本重复测定，其CV值代表Elisa的测定误差。

烧伤组和对照组的AT（u/ml）动态。伤前两组的测值非常接近；并高于正常犬静脉血的含量。两组的SD值均较大而且接近，这表明两组动物的个体误差较大，因为测量误差(8%)相对地小；还表明两组犬对烧伤前的准备处理的应答能力是接近的。烧后5′—30′时域内，两组的测值基本上没有差别并接近伤前和原来的水平。60′—120′的期间，烧伤犬明显高于伤前，$p<0.05$；对照组只有微弱的上升。240′后，两组的AT均进一步升高，$p<0.05$。两组的SD在各个时间都较大，但烧伤组的更大一些，这表明烧伤这个因素使动物的个体差异更加突出，提示两组动物的AT合成、代谢和调控的能力大不相同。

左心室血浆AT（$\bar{u}$/ml±SD）动态比较

组别	犬数	烧前	烧后时间（分） 5′	30′	60′	120′	240′
烧伤	14	32.50±23.11	34.86±32.06	33.93±32.64	61.34*±44.13	61.14*±24.69	75.75*±38.44
对照	10	36.50±26.12	33.60±24.15	32.10±17.66	41.30±25.14	44.50±25.41	△69.20*±29.82

*：本组自身比较，$P<0.05$。　△：组间时域比较，$P_{60'—120'}<0.02$

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

就单个时间进行组间比较，30′以前两组AT值没有差别，以后的差异也不够明显：$P_{60'}=0.1$，$P_{120'}=0.15$。如就一个时域进行组间比较，根据二以上事件集团出现概率计算法进行差异显著性测验[20]，则$P_{60'-120'}<0.02$。似可断言在烧后60′—120′这一段时间，两组的AT测值有显著的差异。

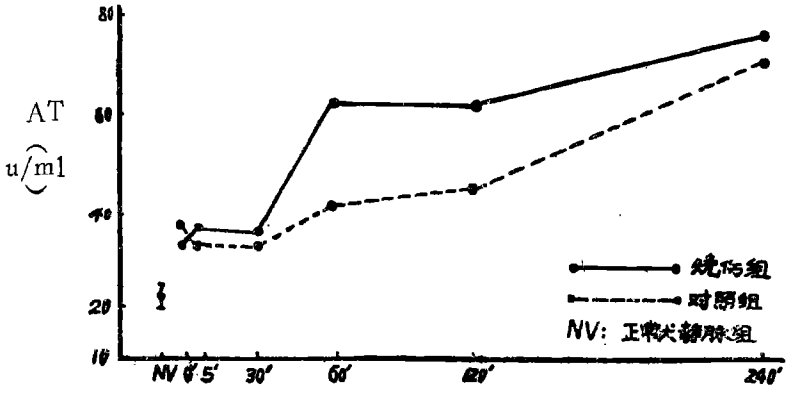


图1　烧伤犬、对照犬左心血AT动态

讨　论

一、呼吸道蒸汽烧伤后早期AT在左心血内增加的原因

AT是C_3和C_5活化后放出的小分子肽，主要是C_3a和C_5a。能使补体活化的原因很多[21]：第一类，在生理学条件下起作用。如血内的纤维蛋白酶、胰酶、凝乳酶和天然的Ig聚合物；随食物、空气和体表微裂而入体内的真菌、异体蛋白、棉纤维、谷物蔬菜来源的外源植物血凝素（Lectin）等等。它们大多直接裂解补体，或经旁路活化补体。第二类，在病理条件下活化补体。如活化的海格满因子，暴露的基底膜，因炎症或血凝出现的胶原纤维，细菌内毒素，石棉纤维，晶体尿酸钠，血管造影剂，热聚蛋白，CRP，甚致某些抗菌素和输血。免疫复合物不仅在病理情况下出现于体内，生理情况下出现少量，不过作用较小。AT在血内的水平受两个方面调控：一方面内皮、肝脏和巨噬细胞等不断合成补体，经常路和旁路不断活化而提供AT。一方面是AT不断被血内羧基多肽酶B等破坏，被介质细胞和内皮细皮细胞等吸附，AT达到一定浓度后，则出现对补体活化的反馈抑制。因此平时血内AT维持在一个低而稳定的水平[22]，只有在较为严重的病理情况下才会出现明显的升降[22][23][24]。上述的调控能力由基因决定的，所以同样的病理条件下而个体的AT水平却各不相同，其予后也不一样[25]。

正常犬静脉血内也有AT，其原因是上文的第一类因素起作用。

烧前测得的两组AT值均高于正常犬静脉血内含量，个体误差较大。这是因为除上文第一类因素外，还有组织损伤、塑料插管、输血输液的影响。对照组在实验开始到120′期间的AT水平没有明显的变化，其原因亦如前述。240′测值明显高于原来的水平，但仍低于烧伤组，可能是因实验条件长时间作用，AT在左心血内暂时增多。

烧伤组AT值在烧后60′—120′不仅明显高于烧前而且也明显超过对照组。烧伤组AT

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

增多主要是由烧伤引起的。

把血清在水浴内加热80℃15″或100℃5″，其中的Ig即因热而聚合并能活化补体[29]。在实验条件相同的另一组动物左心血内也查到了聚合蛋白，并在烧后30′高于对照组测值[27]；因系PEG比浊法测定，故测值内可能含有免疫复合物。

根据这些，初步的结论是：呼吸道蒸汽烧伤犬左心血内AT在伤后60′—120′期间明显升高的原因，主要是烧伤，且与血内出现热聚蛋白有关。

二、肺间质血内AT增多与炎症介质释放

左心室血直接来自肺静脉，其流程甚短。其中AT和炎症介质的动态，当与肺间质内的近似。

（一）组织胺。本组动物烧后60′的左心血内组织胺高于伤前（109.6±26.3ng/ml）；持续上升到240′（132.9±17.4ng/ml）才明显地高于伤前和对照组（86.5±12.8ng/ml），$p<0.05$[28]。同实验条件的一组动物的右心血测值则无上述差异；烧后4小时肺组织内的组织胺，烧伤组的反而明显偏低，$p<0.05$。这说明左心血内组织胺来自烧伤的肺组织。

一般认为肺内组织胺主要来自肥大细胞，可能还有嗜硷淋巴细胞[29]，它们都是固定的炎症介质细胞。病理情况下肺内也出现嗜硷、嗜中性白细胞和血小板[29][30]，它们都是游动的炎症介质细胞。原则上这五种细胞非损伤地释放介质的机制相同：交联剂（Ligant）结合胞膜受体，丝氨酸脂酶活化，Ca^{++}进入胞内，释放能量，微管和肌动蛋白收缩，脱颗粒，放介质。交联剂结合受体是始动的一步。交联剂大别为四类[31]：（1）IgE（或IgG）-Ag复合物。与本文无关，因烧后4小时还不可能产生过敏抗体。（2）血内流动的介质细胞因故相互粘结成团。在本实验里并不重要：首先，烧后左心血组织胺高峰在4小时，但此时肺组织内微血栓不多；只见到固定的肥大细胞脱粒明显（60—94%），多于对照组，$P<0.001$[37]。其次，左、右心血和肺组织内的5HT测值均无明显的差异[32]，也支持这个看法。因此说：前述组织胺主要来自肥大的细胞，与游动的介质细胞相互粘接无关。（3）因血凝或炎症放出的蛋白酶类。在本文中也不占主要地位，一是炎症的出现还为时过早，二是肺组织切片所见出血、血凝和炎症细胞不多。（4）AT或其衍生的硷性小分子肽类[31]。AT的活性依赖C—端的5—7个氨基酸[10]，任何因素分解AT时只要不伤及这个部份，这一小段硷性肽仍有交联肥大细胞的作用。综合以上讨论，排除前三类交联剂的作用后，初步认为AT是本实验左心血组织胺增多、肥大细胞脱粒的重要原因。不排除热力直接对气道近周肥大细胞的影响。

（二）PgE_1

呼吸道蒸汽烧伤动物肺血管通透性增加，抗组织胺药物不能完全防止[2][3]，表明还有其它介质起作用。体表烧伤的水泡内有pgs出现[33]。AT喷入动物气道能使肺血管通透性增加和肺水肿发生，抗组织胺药物不能完全防止，加用消炎酮后防止效果更佳，表明AT可使肺内产生pgs[26]。相同实验条件的另一组烧伤犬，烧后4小时肺组织匀浆内PgE_1明显上升（37.8±2.8pg/gm），高于对照（29.3±2.7pg/gm）[41]，$P<0.05$。证明了上述的推测。

很多原因都能促使细胞合成pgs，而能合成pgs的细胞也很多。AT可能促使内皮、上皮和肥大细胞合成pgs，通过两个渠道：一是通组织胺；二是直接被内皮细胞吞饮[34]，而吞噬吞饮活动能扰乱细胞膜细构，合成pgs[35]。本实验里，AT可能是pgE_1增多的一个始动原因，不排除其它，如热力对上述三种细胞的影响。

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

三、肺水肿和肺功不全的发生机制中，AT可能起到的作用

本组动物烧后4小时的肺水含量（81.76±1.27%），较对照组（79.60±0.95%）多，$P<0.001$。所有烧伤犬的胸片都有片状的阴影，而对照动物的全无[36]。4小时活杀犬肺组织切片中可见明显的间质肺水肿和肺泡水肿[37]。气管壁充血肿胀，管腔内分泌物较多，杯状细胞增多而且肿胀[37]。这些表明有肺水肿发生和气道阻塞现象。根据PaO_2分压、$PaCO_2$分压和BEb值下降，根据血内pH升高，本组烧伤动物有呼吸性碱中毒和代谢性酸中毒的表现[38]，这也是ARDS的一些早期表征。

根据AT的生物学特性[10]和本文的结果，结合文献资料来看，呼吸道蒸汽烧伤并发肺水肿和肺功不全，AT是有作用，其落足点有三个方面：（1）血管通透性增加。AT直接为血管内皮细胞吞欲，并使后者收缩；间接通过组织胺和pgE_1使内皮细胞cAMP增高，同实验条件的另组动物的测值支持这点[42]。这就导致后者的水电解质渗出增多[38]。(2)气道阻塞。AT直接收缩气道壁平滑肌，促进腺体分泌，这是间接通过组织胺而起这样的作用。(3)导致炎症和感染。AT对嗜中性白细胞具有强烈的趋化作用。经羧基多肽酶及分解后，还有一些趋化性质[10]。但嗜中性白细胞，如其受体被较多的AT结合后，其吞噬能力反而减弱[39]。加之，烧伤后此时总补体和C_3的含量也消耗过多[43]，故感染易于发生。感染则进一步增加血管的通透性[40]。

补体、血凝、激肽三个系统因相互作用而联成网络。烧伤又涉及神经激素。本文未涉及这方面指标，因此，情况不但复杂，而且不明之处也多。AT究竟在呼吸道烧伤发病机制中起多大作用，尚待今后使用防止AT的特异措施，进行实验探讨。

参 考 文 献

（1）Achaure BM：Ann Surg 177:311. 1973

（2）中原·数也，大畑和弘：呼吸と循环，27(1):55，1979

（3）孙秉庸等：上海国际烧伤会议论文摘要，1981

（4）Allgower M：Am N. Y. Acad, Sci, 150:807，1968

（5）Schoenberger GA:Br. J. Surg 55:704，1969

（6）周善章等：全国第二届放射生物学和放射医学学术会议论文选编，1964，P—185，放射医学分册。

（7）Richard JH：Surg. Gyn. Obs. 139:771，1974

（8）Rapaport FT：Immunopathology 6th. Int. Ccn. P-61-64，1978

（9）Sacheyfio H：Br J Pharmacology 43:424，1971；ibid，55:640，1975

(10) Hugli TE：Adv Immunol 26:1—48,1978

(11) Hugli TE：J Immunol 117:1688，1976

(12) Hugli TE：J Biol Chem 256(16):8685，1981

(13) Beebe DP：Clin Immuno Immunopathol 15(1):88,1980

(14) Chemoweth DE：J Immunol Method 25(4):137，1979

(15) Reifeld RA：Nature (London). 195:281，1960

(16) Weir DM:Handbook of Experimental Immunology 1:8—12，1973

(17) Milles AA：J Physiol 118:288，1952

(18) Nawotny A：Basic Exercises in Immunochemistry. Lab. Manual 2nd Ed P—33，1979

(19) 宣武医院：固相酶联免疫测定法。1978，内部资料

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

(20) Fisher RA: Mathmatic Stastics for Res Work P—99, 1954
(21) Wilson MR: J Allergy Clin Immunol 65(5):319, 1980
(22) Chenoweth DE: New Eng J Med 304(9):497, 1981
(23) Craddock PR: New Eng J Med 296:769, 1977
(24) Kiriklin JW: 25th Anniversary. Mayo Clin Proc 55:339, 1980
(25) Dale HSD: Lancet 1(8175):947, 1980
(26) Herdman M: J Trama 19(4):239, 1979
(27) 黄文华等：呼吸道烧伤犬早期血清补体变化及激活补体物质的探索。待发表
(28) 黄瓴华等：组织胺在呼吸道蒸汽烧伤肺水肿发生机制中的作用。待发表
(29) Kirkpatrick CH: Immunologic and Infectious Reaction in the Lung. P—47, 1976
(30) Ottesen EA: In "Immunologic and Infectious Reaction in the Lung." P—289, 1976
(31) Weissmann G: Mediator of Inflammation. P—12, 1974
(23) 董燕麟等：5HT在呼吸道蒸汽烧伤肺水肿发生机理中的作用，待发表
(33) Surgiyama S: Express (Paris) 29(2):51, 1978
(34) Denny JB: Immunology 36(2):51, 1979
(35) Weismann G: Mediator of Inflammation P—174, 1974
(36) 姜坤元等：重度呼吸道蒸汽烧伤犬的临床观察。待发表
(37) 梁延杰等：重度呼吸道蒸汽烧伤肺水肿机制研究。待发表
(38) Burraw W: Textbook of Microbiology. 21 Ed, P—556, 1979
(39) Solomkin JS: Surg 90(2):319, 1981
(40) Hoseak J: J Clin Investig 66(2):175, 1980
(41) 朱玉兰等：重度呼吸道蒸汽烧伤犬的血浆、肺中PGE_1和PGF_2水平。待发表
(42) 姚丹帆等：重度呼吸道蒸汽烧伤肺水肿发生机制的实验研究——血浆及肺内cAMP、cGMP的动态观察。待发表
(43) 汪　涛：大面积烧伤病人早期总补体和C_3的动态。待发表

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