



湿热环境下犬肢体火器伤后中性粒细胞CD11a、CD11b表达的变化

粘附分子对外周血中性粒细胞(PMN)在血管内的滚动、贴壁、粘附和迁移过程起重要作用。CD11a、CD11b属于粘附分子整合素家族中的 $\beta 2$ 亚类,它们及其相应的内皮细胞配体在烧伤、创伤、抗感染免疫中的表达变化一直是人们关注的热点。CD11a、CD11b在湿热环境下肢体火器伤后的表达变化及意义的研究目前尚未见报道。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 试剂 CD11a和CD11b单克隆抗体、大鼠抗小鼠IgG1重链FITC标记二抗、FITC标记F(ab')₂兔抗小鼠IgG、FITC标记大鼠IgG1均由美国Sertec公司生产、深圳精美公司提供;含20 mmol/L葡萄糖及1%小牛血清的PBS液(pH 7.4)、0.5%多聚甲醛、红细胞裂解液均由第一军医大学中心实验室制备。

1.1.2 仪器 Coulter公司流式细胞仪,激发波长488 nm、发射波长522 nm;人工气候模拟仓由第一军医大学热研所提供。

1.1.3 实验动物及分组 南方成年健康杂种犬18只,体质量16.4~20.1 kg(平均18.6 kg),雌雄不拘,由第一军医大学南方医院动物所提供。喂养2~3 d后开始试验。按施加的气象条件随机分为常温常湿枪伤组、高温高湿枪伤组、习服后枪伤组,每组6只。除气象条件外,其他处理因素相同。

1.2 方 法

1.2.1 动物模型建立 3%戊巴比妥钠按1 ml/kg·b.w.肌肉注射,麻醉后气管插管。犬右后肢伸直位木板固定,选择股部内侧肌肉丰厚处并且避开主要的血管和股骨,在距离1 m处用“五四”式手枪射击,伤后伤口立即包扎。高温高湿气象条件通过人工气候模拟仓建立,采用的指标为干球温度(36.0±0.3)℃,相对湿度(68±3)%;常温常湿气象条件为干球温度(27.4±1.4)℃,相对湿度(50.2±5.6)%。习服组通过在高温高湿气象条件下习服2 h/d、连续习服10 d建立。习服前后肛温升高不超过0.5℃、心率升高不明显即认为基本达到习服,习服后的室温保持在22℃以免脱习服,翌日即开始习服实验。

1.2.2 标本采取 实验动物分别于伤前、伤后即刻、伤后30 min、1、2、4、6、8、10、12 h抽取外周静脉血2 ml。同时距伤道0.5 cm处切取肌肉组织1.5 g,置于4%的福尔马林液中保存。

1.2.3 中性粒细胞CD11a、CD11b表达的测定 立即吸取100 μ l全血,加入10 μ l一抗,室温避光孵育30 min,加入2 ml红细胞裂解液,10 min后离心(400 g×5 min)。弃上清,加入二抗,室温孵育30 min,PBS冲洗2次,0.2 ml PBS稀释后加入0.2 ml 0.5%的多聚甲醛固定后,上机检测。

1.2.4 伤道周围组织细菌记数 肌肉称质量后加入0.9%氯化钠液1 ml,无菌研磨器制成匀浆,再以氯化钠液稀释成 1×10^0 、 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 ml溶液,吸取0.01 ml滴于1 cm×1 cm小方格的洁净玻片上,干燥后甲醇固定,革蓝氏染色。显微镜下计算10个视野细菌总数。根据1个视野=0.025 mm²换算出每克组织细菌含量。

1.3 统计学分析

采用SPSS8.0软件处理数据，行单向ANOVA以及组内Dunnett-t检验，两组之间某时间点比较采用两个均数的t检验。

2 结果

2.1 CD11a的变化

常温常湿组与高温高湿组伤前无显著差异，伤后30 min两者均有短暂高表达，之后降低，4 h出现第2个高峰。高温高湿组在30 min~6 h有一持续增高平台期，12 h以后显著下降；常温常湿组在30 min~6 h内每一时间点水平普遍低于高温高湿组，但是平台期维持到12 h以后。习服组与以上两组无显著差异，伤后30 min即显著升高，30 min~4.0 h维持较高水平，之后略下降(表1)。

表 1 各时间点 CD11a 的表达(%, $\bar{x}\pm s$)

Tab.1 Expression of CD11a at different time points after injury (% , Mean \pm SD)

Time after gunshot (h)	NE	HHE	TAT
0 (baseline)	42.47 \pm 4.65	47.97 \pm 5.08	46.63 \pm 5.11
0.5	56.08 \pm 7.91*	69.94 \pm 8.79***	63.04 \pm 7.23**
1	51.74 \pm 6.01	65.18 \pm 11.10**	65.25 \pm 8.29**
2	53.72 \pm 10.23	73.38 \pm 13.14***	60.55 \pm 6.83*
4	61.40 \pm 8.31**	77.01 \pm 9.56***	62.20 \pm 5.04*
6	53.83 \pm 5.85	68.20 \pm 13.39**	53.57 \pm 7.91
8	57.19 \pm 7.44	61.88 \pm 7.76	58.28 \pm 12.30
10	51.22 \pm 10.26	49.72 \pm 8.12	47.63 \pm 11.30
12	46.67 \pm 7.63	31.37 \pm 5.23*	38.92 \pm 5.95

NE: Normal environment group; HHE: Hot and humid environment group; TAT: Thermo-adaptive training group. * P <0.05, ** P <0.01 vs baseline; * P <0.05 vs NE group

2.2 CD11b的变化

各组中性粒细胞CD11b的变化与CD11a变化规律相似，但表达水平显著高于CD11a(表2)。

表 2 各时间点 CD11b 的表达 (% , $\bar{x}\pm s$)Tab.2 Expression of CD11b at different time points after injury (% , Mean \pm SD)

Time after gunshot (h)	NE	HHE	TAT
0 (baseline)	68.15 \pm 7.38	71.55 \pm 5.61	66.46 \pm 7.73
0.5	81.96 \pm 4.86*	87.92 \pm 7.20**	80.56 \pm 11.07*
1	76.15 \pm 11.81	84.56 \pm 4.23*	85.07 \pm 4.15**
2	80.27 \pm 4.73	88.39 \pm 10.02**	79.13 \pm 8.31*
4	87.41 \pm 6.33**	91.92 \pm 6.25**	83.34 \pm 5.66**
6	79.35 \pm 9.17	85.73 \pm 5.53**	76.30 \pm 7.01
8	81.86 \pm 5.41*	77.50 \pm 4.81	70.39 \pm 4.92
10	77.18 \pm 4.87	74.76 \pm 7.33	67.55 \pm 6.96
12	73.19 \pm 8.97	60.13 \pm 8.57*	58.13 \pm 5.58

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs baseline

2.3 伤道周围细菌定量测定

原发伤道周围0.5 cm处肌肉组织细菌定量结果(表3)表明, 常温常湿组12 h细菌记数 $>10^5$, 而高温高湿组及习服组8 h细菌记数即 $>10^5$, 并且高温高湿组细菌计数显著高于习服组($P<0.05$)。

表 3 伤道周围组织细菌记数 (个 /g, $\bar{x}\pm s$)Tab.3 The bacterial quantification in the wound tract after injury (number/g, Mean \pm SD)

Time after gunshot (h)	NE	HHE	TAT
0 (baseline)	(1.37 \pm 0.43) $\times 10^3$	(1.28 \pm 0.39) $\times 10^3$	(1.27 \pm 0.54) $\times 10^3$
4	(3.07 \pm 0.40) $\times 10^3$	(5.65 \pm 3.66) $\times 10^3$	(3.22 \pm 1.24) $\times 10^3$
6	(3.20 \pm 1.02) $\times 10^4$	(3.52 \pm 1.53) $\times 10^{4*}$	(3.39 \pm 0.93) $\times 10^4$
8	(7.03 \pm 2.71) $\times 10^{4*}$	(3.94 \pm 3.88) $\times 10^5$	(1.20 \pm 0.71) $\times 10^{5**}$
12	(5.49 \pm 3.31) $\times 10^5$	(2.16 \pm 0.97) $\times 10^6$	(2.01 \pm 1.83) $\times 10^{5*}$

* $P<0.05$ vs baseline; * $P<0.05$ vs HHE group

3 讨论

湿热环境下战创伤主要引起机体的非特异性抗感染免疫, 其中中性粒细胞与内皮细胞表面粘附分子的相互作用是最初的反应特征, 并导致PMN细胞贴壁、向炎症部位移行而发挥吞噬功能。其中血流扰动和血液动力学发生改变, 内皮素、NO可能参与这个过程[1]; 白介素-1、肿瘤坏死因子、组胺、内毒素、热休克蛋白、转化生长因子- β 等细胞因子的参与也是引起PMN细胞CD11a、CD11b等粘附分子表达和功能变化的重要中间环节[2][3][4]。

本试验中PMN细胞表面的CD11a、CD11b变化规律趋于一致, 但CD11b在基础和刺激后反应水平都明显高于CD11a, 可能是因为CD11a在所有的白细胞中都有表达, 包括许多源于白细胞的细胞(如巨噬细胞、树突状细胞), 而CD11b分布局限于中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞和部分淋巴细胞亚群(如NK细胞、CTLs细胞), 但创伤免疫是以中性粒细胞激活为主的抗感染免疫。CD11a、CD11b在3组动物中的表达也是不同的。常温常湿组

在伤后30 min~4 h分别有两个高峰, 12 h后无显著下降; 高温高湿组也出现两个峰, 但第2峰水平高、维持时间短, 12 h显著下降; 习服组则无类似的马鞍状表现, 表现为单峰样改变, 峰出现时间早, 水平介于上述两组之间。CD11a、CD11b在PMN的早期短暂高表达可能是外来因素刺激引起的膜分布改变, 4 h峰可能代表机体接受刺激、启动基因转录到蛋白质合成的过程[5]。12 h时高温高湿组表达的下降反映PMN细胞功能的下降。以上结果表明, CD11a、CD11b随时间的变化规律结合表达水平能反映机体所处的免疫状态, 可以用作反映机体免疫功能的指标。

多数学者认为, PMN活化对创伤后多器官功能不全以及一系列病理过程中起着不良作用, PMN-内皮素的粘附是其组织损伤的关键[2][3][4]。在心脏手术、创伤、烧伤等的研究中发现, 它们的过度表达与后期的肺功能损伤、内皮细胞损伤等有相关性[3][4]。本试验也验证了这一点, 高温高湿组中CD11a、CD11b过高表达的直接后果是阻塞心脏、肺脏等的微循环, 引起一系列器官功能障碍和心肺功能衰竭, 具体机制可能是: (1) 随着粒细胞与内皮细胞粘附增强, 大量血浆蛋白, 尤其是纤维蛋白聚集于血管壁, 使管壁变厚、管腔狭窄, 影响组织特别是半缺血性部位的血供; (2) 中性粒细胞在缺血区浸润和聚集阻断了毛细血管的再灌注, 造成“无再流”现象; (3) 粒细胞透过血管内皮细胞游走到正常组织或损伤区, 释放一些细胞因子等毒性物质, 加剧了组织的坏死或凋亡; (3) 血管内皮细胞上相应配体的调节作用。因此, 如果在疾病的某一阶段使用针对CD11a、CD11b的抗体或其配体的单克隆抗体, 无疑会保护器官的功能。但也有不同的观点, 赵克森[5]认为在大鼠烧伤模型中, 粘附分子构型改变比数量增加更能引起微循环的嵌顿和“无复流”现象, 并认为中药虎杖能显著延长动物的生存时间。

细菌记数结果显示, 高温高湿条件下细菌增殖明显增快, 8 h即达创口感染级别, 而习服组8 h虽然亦达 10^5 上限, 但显著低于高温高湿组水平。高温高湿组中细菌记数与CD11a、CD11b降低有时间上的相关性, 反映了CD11a、CD11b作为高温高湿战创伤中病理变化的一个中间过程可能起着多方面的作用: 一方面是机体中性粒细胞激活的标志, 加强了机体的免疫功能; 另一方面又因为失调性过高表达造成了炎性细胞在肺脏、肾脏等血管内皮的沉积, 最终导致机体的损伤。深层次的机制尚待进一步研究。

参考文献:

[1] 李曙光, 王建民, 刘荫秋, 等. 枪弹所致血流强扰动后血液流变学变化及其对伤情转归的影响[J]. 生物医学工程学杂志, 1998, 15(1):49-52.

[2] Lo SK, Rohman A, Xu N, et al. Neutrophil inhibitory factor abrogates neutrophil adhesion by blockade of CD11a and CD11b $\beta 2$ integrins[J]. Mol Pharmacol, 1999, 56(5):926-32.

[3] Dreyer WJ, Michael LH, Milman EE, et al. Neutrophil activation and adhesion molecule expression in a canine model of open heart surgery with cardiopulmonary bypass [J]. Cardiovasc Res, 1995, 29(6):775-81.

[4] 李志清, 杨宗城, 罗向东, 等. CD11/CD18在烧伤早期中性粒细胞对内皮细胞粘附中的作用及变化[J]. 中华整形烧伤外科杂志, 1997, 13(5):373-6.

[5] 赵克森. 重症休克时白细胞流变行为的研究进展[J]. 微循环学杂志, 1997, 7(1):12-3.

参考文献:

[1] 李曙光, 王建民, 刘荫秋, 等. 枪弹所致血流强扰动后血液流变学变化及其对伤情转归的影响[J]. 生物医学工程学杂志, 1998, 15(1):49-52.

[2] Lo SK, Rohman A, Xu N, et al. Neutrophil inhibitory factor abrogates neutrophil adhesion by blockade of CD11a and CD11b $\beta 2$ integrins[J]. Mol Pharmacol, 1999, 56(5):926-32.

[3] Dreyer WJ, Michael LH, Milman EE, et al. Neutrophil activation and adhesion molecule expression in a canine model of open heart surgery with cardiopulmonary bypass [J]. Cardiovasc Res, 1995, 29(6):775-81.

[4] 李志清, 杨宗城, 罗向东, 等. CD11/CD18在烧伤早期中性粒细胞对内皮细胞粘附中的作用及变化[J]. 中华整形烧伤外科杂志, 1997, 13(5):373-6.

回结果列表