

湿热环境下犬肢体枪伤后外周血淋巴细胞亚群的变化

周祥吉¹, 裴国献¹, 张旭辉¹, 罗炳德²

(1. 第一军医大学南方医院创伤骨科, 广东 广州 510515; 2. 第一军医大学热带病研究所, 广东 广州 510515)

摘要: 目的 探讨湿热环境下机体战创伤后淋巴细胞亚群的动态变化, 了解机体免疫功能变化的规律。方法 24 只南方杂种犬按外部环境随机分为常温常湿组、高温高湿组、习服组, 并用单克隆抗体-流式细胞仪荧光抗体技术动态检测犬肢体枪伤后, 外周血淋巴细胞表面 CD4⁺、CD8⁺、CD11a⁺、CD11b⁺ 亚群表达结果。结果 复合因素作用下, 淋巴细胞 CD4⁺ 亚群表达水平 1h 短暂升高, 随后下降, 10h 后明显降低; CD8⁺ 亚群 4h 后表达水平显著增高, 相应导致 CD4⁺/CD8⁺ 比值 8h 后持续降低; CD11a⁺ 亚群的降低 (8h 后) 表明机体对感染的易感性增加, 而 CD11b⁺ 亚群的变化轻微; 热习服能够增加 CD4⁺ 的表达值, 抑制 CD8⁺ 大量表达。结论 CD4⁺、CD8⁺、CD11a⁺ 亚群以及 CD4⁺/CD8⁺ 比值的变化反映了复合因素长时间作用下能够对机体免疫功能产生抑制; 热习服能使机体对这种反应趋于耐受。

关键词: 淋巴细胞亚群; 高温高湿环境; 枪伤

中图分类号: R134.3 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2001)06-0339-03

Changes of the lymphocyte subsets expression in a canine model of gunshot wound in limbs at a hot and humid environment

ZHOU Xiang-ji¹, PEI Guo-xian¹, ZHANG Xu-hui¹, LUO Bing-de²

(Department of Orthopaedics, Nanfang Hospital, The First Military Medical University, Guangzhou 510515, China; 2. Institute of Tropical Diseases, The First Military University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: **Objective** To study the changes in immunological competence of the circulating blood lymphocyte subsets in a canine model of gunshot wound in limbs at a hot and humid environment. **Methods** 18 Chinese southern hybrid canines are divided into 3 groups randomly according to the given environments: Group A (control), Group B (hyperthermal and humid), Group C (adaptive); the dynamic changes of the peripheral blood lymphocyte subsets including CD4⁺, CD8⁺, CD11a⁺, CD11b⁺ expressions were detected post-trauma using mAb-FACS-immunofluorescence technique. **Results** There was temporary increase (1h) and a persist decrease (10h) in CD4⁺ subset, while the CD8⁺ subset increased (4h later) that resulted in a final decrease of CD4⁺/CD8⁺ ratio. In addition, CD11a⁺ T cell decrease 8h later might lead to the increased susceptibility to infections. Mild change was found in CD11b⁺ subset, the mechanism is now unclear. Adaptation training seemed to raise the level of CD4⁺ subsets and suppress the expression of CD8⁺ subset. **Conclusions** Changes in CD4⁺, CD8⁺, CD11a⁺ lymphocyte subsets suggest that the long term effect of complex factors might suppress the immunological competence of organisms and adaptation exercise has a beneficial effect on the adverse circumstances.

Key words: T cell subset; Hyperthermia and humid environment; Gunshot wound

高温高湿条件下复合战、创伤的研究鲜见文献报道, 相关的研究如日射、高温、烧伤、常温下的战创伤, 或高寒、高原条件下的战创伤等, 多为单因素或双因素作用的结果。研究这种特殊环境对机体免疫功能的影响, 有助于解决高温高湿环境下工作、训练或者军人的机体防护问题, 有助于该环境下机体创伤后的临床救治。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 CD11a 单克隆抗体 (Colone number: CA11.4D3); CD11b 单克隆抗体 (Colone number: CA16.3E10); 大鼠抗小鼠 IgG1 重链 FITC 标记二抗 (Colone number: MCA336F); 阴性对照: FITC 标记 F(ab)2 兔抗小鼠 IgG (Colone number: STAR9), FITC 标记大鼠 IgG1 (Colone number: MCA1211F); Rat-anti canine CD4: FITC (Colone number: YKIX302.9); Rat-anti canine CD8: RPE (Colone number: YCATE55.9);

收稿日期: 2001-01-24; 修回日期: 2001-06-12

作者简介: 周祥吉 (1967-), 男, 山东潍坊, 硕士, 现从事热带气象条件下的战创伤研究。

红细胞裂解液 (Colone number: BUF04), 以上产品由美国 Sertec 公司提供。含 20 mmol/L 的葡萄糖以及 1% 的小牛血清的 PBS 液 (pH 7.4); 0.5% 多聚甲醛。

1.1.2 仪器 Coulter 公司流式细胞仪 (Elite ESP), 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: “五四”式手枪、子弹由第一军医大学军务处提供。

1.1.3 实验动物及分组 南方成年健康杂种犬 18 只, 雄性, 体质量 16.4~20.1 kg。随机分为常温常湿组、高温高湿组、习服组, 除气象条件或预处理不同外, 枪伤等处理因素相同。

1.1.4 动物模型建立 用 3% 的戊巴比妥钠按 1 ml/kg 肌注麻醉, 气管插管, 戊巴比妥钠 6mg/(kg·h) 静脉维持。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神经和股骨, 距离 1m 用“五四”式手枪射击致伤, 伤口无菌敷料立即包扎。高温高湿气象条件由本校热带病研究所的人工气候模拟仓建立, 采用的指标: 干球温度 (36.0±0.3) °C, 相对湿度 (68±3)%。习服组通过在上述气象条件下每日习服 2 小时, 连续习服 10 日, 10 日后进入高温高湿环境肛温升高不超过 0.5 °C, 心率升高不明显即认为达到习服; 习服后的室温保持在 22 °C 以免脱习服; 习服翌日即开始实验。气象条件与枪伤因素基本同一时间给予。

1.1.5 标本采取 实验动物分别于伤前, 伤后 0.5、1、2、4、6、8、10、12h 抽取外周静脉血 2ml, EDTA

抗凝并充分摇匀。

1.2 方法

1.2.1 淋巴细胞 CD11a⁺、CD11b⁺ 表达的测定 立即吸取 100 μl 全血, 加入 10 μl 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, 待上机检测。

1.2.2 淋巴细胞 CD4⁺、CD8⁺ 表达的测定 立即吸取 100 μl 全血, 加入 10 μl 一抗, 室温避光孵育 30 min, 加入 2 ml 红细胞裂解液, 30 min 后离心 (400 g×5 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, 4 °C 冰箱保存, 待上机检测。

1.2.3 统计学处理 结果以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用 SPSS8.0 统计软件处理, 行单向 ANOVA 以及 Dunnett-t 检验, 两组均数用 *t* 检验。

2 结果

2.1 CD4⁺、CD8⁺ 表达以及 CD4⁺/CD8⁺ 比值的变化

CD4⁺ 亚群在高温高湿组伤后 1 h 显著增高, 但随后下降, 10 h 后显著下降; 而在常温常湿组中 4~6 h 升高显著, 12 h 开始下降; 习服后基础值要高于高温高湿组 ($P < 0.05$), 10 h 显著下降。CD8⁺ 亚群在高温高湿组以及常温常湿组中 4 h 后增高显著, 但在高温高湿组中升高更显著; 而习服后除 2 h 有增高外变化不大 (表 1)。

表 1 各时间点 CD4⁺、CD8⁺ 表达的检测结果 (% , $\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	CD4 ⁺			CD8 ⁺		
	常温常湿组	高温高湿组	习服组	常温常湿组	高温高湿组	习服组
伤前	36.37±3.83	35.14±5.52	41.13±3.59*	26.28±5.72	26.92±3.07	29.19±4.15
伤后 0.5 h	40.15±3.09	43.80±7.09	47.04±3.71	28.57±4.28	30.06±4.04	32.67±4.97
1 h	38.84±5.47	45.63±3.62*	49.26±5.75	27.53±6.23	28.87±3.66	34.05±5.79
2 h	43.31±4.03	35.18±6.04	43.70±9.07	28.67±3.43	31.25±3.94	39.09±7.27*
4 h	48.25±5.19**	40.88±6.17	40.23±5.92	34.53±6.37*	38.83±2.79**	33.33±4.67
6 h	45.62±4.85*	36.21±7.85	38.41±8.89	37.50±3.38**	42.85±3.23**	35.51±4.01
8 h	37.49±5.71	31.64±5.13	33.92±6.30	34.57±4.39*	39.74±5.97**	33.67±3.46
10 h	33.37±6.80	22.02±3.55**	29.31±8.27*	33.67±2.46	31.37±6.79	28.15±3.39
12 h	28.34±4.21*	19.38±4.96**	23.76±7.35**	32.18±3.90	26.58±6.34	29.39±4.36

*与伤前比较 $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, 下同。

CD4⁺/CD8⁺ 比值在高温高湿组 1 h 增高, 4 h 开始下降; 在常温常湿组 8 h 前变化不显著, 伤后 12 h 显著下降 ($P<0.05$); 习服组伤后 8 h CD4⁺/CD8⁺ 比值下降但要高于高温高湿组相同时间点水平 (见表 2)。

2. 2 淋巴细胞 CD11a⁺、CD11b⁺ 表达变化

淋巴细胞 CD11a⁺ 亚群在常温常湿组中伤后 4 h 升高显著, 而在高温高湿组和习服组分别在伤后 8、12 h 开始下降; 习服组基础值水平高于另两组, 但差别无统计学意义。CD11b⁺ 亚群除在高温高湿组 12 h

表 2 各时间点 CD4⁺/CD8⁺ 比值 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	常温常湿组	高温高湿组	习服组
伤前	1.38±0.34	1.35±0.16	1.41±0.33
伤后 1 h	1.41±0.42	1.51±0.12 [*]	1.20±0.29
4 h	1.26±0.31	1.03±0.18 [*]	1.18±0.26
8 h	1.08±0.15	0.79±0.20 ^{**}	0.98±0.10 [*]
12 h	0.87±0.21 [*]	0.72±0.17 ^{**}	0.80±0.11 ^{**}

下降显著外, 其余各时间点差别无统计学意义 (表 3)。

表 3 各时间点 CD11a⁺、CD11b⁺ 表达的检测结果 (% , $\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	CD11a ⁺			CD11b ⁺		
	常温常湿组	高温高湿组	习服组	常温常湿组	高温高湿组	习服组
伤前	51.25±7.39	53.31±5.79	57.43±3.01	76.18±3.91	79.37±5.32	81.24±8.50
伤后 1 h	55.13±6.66	58.64±6.45	60.02±5.95	77.19±5.44	82.57±3.05	88.07±5.03
4 h	62.96±3.80 [*]	60.21±7.01	61.33±7.39	80.37±4.29	85.66±6.41	79.85±8.29
8 h	61.23±8.11	44.27±5.97 [*]	58.96±8.47	84.02±8.05	73.12±8.90	77.43±6.49
12 h	57.42±7.99	36.82±4.33 ^{**}	47.50±4.12 [*]	78.45±8.37	69.61±5.27 [*]	70.30±7.72

3 讨论

本实验中, 常温常湿组枪伤后犬外周血淋巴细胞 CD4⁺ 亚群呈先升高 (4 h) 后降低 (12 h) 的过程, 反映了枪伤因素作用于机体会引起机体免疫机能先升高后逐步下降的过程; 接受复合因素刺激后则表现为升高 (1 h), 随后逐渐下降, 10 h 已经显著低于基础值, 说明复合因素对 CD4⁺ 抑制作用明显加强; 而 CD8⁺ 亚群在以上两组中 4h 之前变化不大, 4 h 之后逐渐升高, 尤其在高温高湿组中升高更显著。Oglesbee MJ^[1] 以及 Keams RJ^[2] 曾发现, 通过体外循环静脉血加温制造的全身高热模型中, 发现不仅淋巴细胞绝对值显著下降, 各淋巴细胞亚群也会发生选择性的变化, 其中 CD8⁺ 与 CD4⁺ 亚群都显著降低并且 CD8⁺ 亚群对热敏感性更强, 从而导致 CD4⁺/CD8⁺ 比值早期可能显著增高。本实验中也发现淋巴细胞绝对值下降, 但高温高湿组早期 (4 h 前) CD8⁺ 与 CD4⁺ 亚群减低都不显著, 并且 CD8⁺ 亚群后期显著增高, 这可能是多种损害因素并存造成的综合效应。

虽然 CD4⁺/CD8⁺ 不能完全代表 Th/Ts 变化, 但是 CD4⁺/CD8⁺ 比值在高温高湿组中的变化还是某种程度上反映了机体的免疫状态是有短暂升高 (1 h 前) 后抑制 (1 h 后) 的过程。而习服组后期 (4~12 h) CD4⁺/CD8⁺ 值高于同时间点高温高湿组水平, 说明机体习服后对湿热环境耐受性增强。

CD11a⁺ 淋巴细胞亚群在高温高湿组中降低 (8 h、12 h), 而 CD11b⁺ 亚群变化轻微, 它们的表达非常广泛并且作用复杂, 但在抗感染免疫中有报道 CD11a⁺ 淋巴细胞亚群介导了淋巴细胞与内皮细胞的粘附, 它的降低可能反映了机体对感染的易感性增强, 同时 CD11a⁺ 淋巴细胞亚群也是抗原传递和 T 细胞活化不可缺少的重要辅助因素。虽然本实验模型是一种主要以中性粒细胞参与的抗感染免疫模型, 但 CD4⁺、CD8⁺ 亚群参与了重要的调节作用, 而 CD11a⁺ 分子与其配体 (如 ICAM-1) 结合在信息传递和引起 CD4⁺、CD8⁺ 亚群激活方面是不可缺少的, 否则会导致 T 细胞的无反应性。实验还发现高温高湿组后期 (8 h~16 h) CD4⁺、CD8⁺ 亚群变化趋于稳定, 这与 CD8⁺ 亚群活化需要 CD4⁺ 亚群辅助相吻合。

参考文献:

[1] Kearns RJ, Ringler S, Krakowka S. The effects of extracorporeal whole body hyperthermia on the functional and phenotypic features of canine peripheral blood mononuclear cells [J]. Clin Exp Immunol. 1999; 116 (1): 188-192.

[2] Oglesbee MJ, Diehl K, Crawford E. Whole body hyperthermia: effects upon canine immune and hemostatic functions [J]. Vet Immunol Immunopathol. 1999; 94 (6): 85-99.

[3] Muhammad M, Hanmani, Abderre Bouchana, Essam Shail, et al. Lymphocyte subsets and adhesion molecules expression in heatstroke and heatstress [J]. J Appl Physiol. 1998; 84 (5): 1615-1621.