

当归对慢性支气管炎肺泡巨噬细胞上 CD11c 和 CD14 表达的影响

彭 则¹ 张珍祥¹ 徐永健¹ 宋满景² 刘卓拉²

内容提要 目的: 探讨当归对慢性支气管炎(慢支)肺泡巨噬细胞(alveolar macrophage, AM)膜上 CD11c 和 CD14 表达的影响。方法: 慢支缓解期患者和正常对照者各 10 例。经局部支气管肺泡灌洗获取 AM; 加当归、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)体外培养 24h 后, 以流式细胞仪分析其 CD11c 和 CD14 表达的百分率; 测定其胞浆游离钙水平。结果: 慢支者 AM 膜上 CD11c 和 CD14 的表达均显著高于正常对照者 ($P < 0.05$); LPS 可使慢支者 AM 膜上 CD11c 的表达进一步增加 ($P < 0.05$); 当归可使慢支者 AM 膜上 CD11c 的过度表达 ($P < 0.05$)。慢支者 AM 胞浆中基础钙水平较正常对照者明显增高 ($P < 0.05$); LPS 促进慢支 AM 胞浆游离钙水平的升高 ($P < 0.05$); 当归可抑制 LPS 对慢支 AM 胞浆游离钙水平的升高作用 ($P < 0.05$)。结论: 当归通过抑制慢支患者 AM 胞浆游离钙水平升高下调其 CD11c 的表达, 提示当归对于慢支缓解期气道内非特异性炎症可能具有抑制作用。

关键词 当归 巨噬细胞 CD11c CD14 钙

Effect of *Angelica sinensis* Injection on CD11c and CD14 Expression in Alveolar Macrophage Membrane of Chronic Bronchitis Patients Peng Ze, Zhang Zhenxiang, Xu Yongjian, et al *Department of Pulmonary Diseases, Tongji Hospital of Tongji Medical University, Wuhan (430030)*

Objective: To explore the effect of *Angelica sinensis* injection (ASI) in CD11c and CD14 expression in alveolar macrophage (AM) membrane of chronic bronchitis patients. **Methods:** AM from 10 chronic bronchitis patients (remission stage) and 10 healthy subjects was obtained by bronchoalveolar lavage. After had cultured for 24 hours with ASI or/and lipopolysaccharide (LPS), CD11c and CD14 expression and intracellular calcium ion concentration in AM were analyzed by flow cytometry. **Results:** CD11c and CD14 expression levels of patients' AM membrane ($n = 10$) were $(39.17 \pm 5.56)\%$ and $(35.73 \pm 8.05)\%$ respectively, which were significantly higher than those of the control [$n = 10$, $(16.29 \pm 3.78)\%$ and $(15.26 \pm 5.96)\%$], $P < 0.05$. LPS could increase the elevation of CD11c expression of patients [$(47.25 \pm 7.00)\%$, $P < 0.05$], while ASI could reduce the increment [LPS Plus ASI group $(27.61 \pm 8.64)\%$, $P < 0.05$]. The basic calcium level of AM cytoplasm of patients was (189.47 ± 23.69) nmol/L ($n = 7$), which was higher than that of healthy control (99.65 ± 32.21) nmol/L ($n = 6$), $P < 0.05$. The intracellular calcium ion elevation in AM of patients could be induced by LPS, and ASI could inhibit the elevation. The calcium level in LPS group was (288.47 ± 43.68) nmol/L, in ASI Plus LPS group, (236.68 ± 28.60) nmol/L, $P < 0.05$. **Conclusions:** ASI could reduce the CD11c expression in AM of chronic bronchitis patients by inhibiting LPS induced intracellular calcium ion elevation in AM, suggesting that ASI may inhibit non-specific inflammation of respiratory tract.

Key words *Angelica sinensis* injection, macrophage, CD11c, CD14, calcium

慢性支气管炎(慢支)患者气道内存在不同程度的慢性非特异性炎症, 较多研究证明肺泡巨噬细胞

(AM) 为气道局部炎症反应的主要始动细胞⁽¹⁾。脂多糖(LPS)等细菌表面有效抗原通过与 AM 膜上 CD11c/CD18 和 CD14 两种受体结合^(1,2), 导致胞浆游离钙水平的升高, 最终引起肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 (IL-1)、白细胞介素-8 (IL-8)、NO 等多种炎症介质的合成分泌, 参与始动局部的炎

1. 同济医科大学同济医院呼吸内科(武汉 430030); 2. 山西医科大学第二医院呼吸内科

性反应。而 AM 胞浆游离钙水平的升高又通过正反馈机制, 导致膜上 CD11c/CD18 和 CD14 两种受体的表达上调^[3]。当归通过其钙通道阻断作用, 可缓解冠状动脉痉挛^[4], 但对慢支气道内 AM 的作用国内外尚少见报道。我们通过观察当归对 LPS 诱导的 AM 胞浆游离钙水平变化及 CD11c 和 CD14 表达的影响, 了解当归是否影响慢支患者 AM 的激活, 为控制该病缓解期气道内的炎症损害从治疗角度提供一些新线索。

资料与方法

1 临床资料

1.1 病例选择 10 例慢支缓解期患者经结合临床病史体征、胸片及肺功能检查确诊, 符合 1979 年全国慢性支气管炎临床专业会议诊断标准。男 7 例, 女 3 例, 年龄 51~70 岁, 平均 (62.13 ± 2.77) 岁。另选 10 例门诊患者健侧肺作正常对照, 男 6 例, 女 4 例, 年龄 45~66 岁, 平均 (60.09 ± 8.92) 岁。支气管肺泡灌洗术前未服用或吸入糖皮质激素史。

1.2 主要试剂及仪器 PE 耦联的鼠抗人 CD11c 和 FITC 耦联的鼠抗人 CD14 单克隆抗体为美国 Pharmingen 公司产品; Fura-2/AM 购自中国医学科学院药物研究所; 25% 当归注射液购自湖北医科大学第二医院制剂室; LPS、EGTA 和牛血清白蛋白系 Sigma 公司产品; Triton X-100 和 HEPES 分别为 SERVA 公司及 Merck 公司产品; Olmpus BF P30 支气管纤维内镜系日本产; Becton Dickinson FACS Calibur 系美国 Becton Dickinson 公司产; RF-5000 紫外荧光分光光度计系日本 Shimadzu 公司产。

2 方法

2.1 支气管肺泡灌洗及回收液的处理 采用文献^[5]提供的支气管肺泡灌洗技术进行。

2.2 AM 的纯化 采用 Iwamoto 等^[6]方法进行。纯化后用 1640 培养基调整细胞浓度至 $1 \times 10^6/\text{ml}$, 存活率在 95% 以上。

2.3 AM 膜上 CD11c 和 CD14 的检测 取上述纯化的 AM 各 1ml 分别加入 24 孔培养板中, 依次为空白对照孔、LPS 孔、当归加 LPS 孔, 所加 LPS 为 $1\mu\text{g}/\text{孔}$, 当归的剂量参照文献^[7]为每孔 $500\mu\text{g}$ 。另

外, 当归均是先与 AM 孵化 0.5h 后才加 LPS。37℃, 5% 二氧化碳及饱和湿度下培养 24h 后取出, 1200r/min 离心 5min, 弃上清, 再次用 1640 培养基调整细胞浓度至 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 。分别取该细胞悬液 $100\mu\text{l}$, 加入 PE 标记 CD11c 和 FITC 标记的 CD14 单克隆抗体各 $20\mu\text{l}$, 4℃ 孵育 30min, 用 PBS 缓冲液洗 2 次后以 1% 多聚甲醛固定, 在流式细胞仪上检测。每份标本测定 1×10^4 个细胞。

2.4 AM 胞浆游离钙水平的测定 参照 Gryniewicz 等^[8]的方法, 将上述两组中 7 例慢支患者和 6 例正常对照者已纯化的 AM, 悬浮于含 2mmol/L 谷氨酸、10mmol/L HEPES 和 0.1% 牛血清白蛋白的 1640 培养基中。调整每管内 AM 为 $0.5 \times 10^6/\text{ml} \times 4\text{ml}$, 共 3 管, 37℃ 预温 5min 后加入 Fura-2/AM (终浓度为 $5\mu\text{mol}/\text{L}$), 37℃ 恒温振荡 45min, 用含 0.1% 牛血清白蛋白的 D-Hanks 液洗 AM 3 次, 以无钙盐水 (pH7.4) 37℃ 再孵育 5min 后置荧光分光光度计 (激发波长 340nm 和 380nm, 发射波长 500nm) 上测定胞浆游离钙。在测定过程中于上述已孵化后的 3 管 AM 中所加试剂依次为 LPS; 氯化钙加 LPS; 氯化钙加当归加 LPS。其中氯化钙、LPS、当归的终浓度分别为 1mmol/L、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $125\mu\text{g}/\text{ml}$, 且当归先于 LPS 与 AM 孵化 10min。

2.5 统计学处理 CD11c 和 CD14 测定所用流式细胞仪的计算机与数据处理系统为 Macintosh Power PC, 使用软件为 Cell Quest; AM 胞浆游离钙水平测定所用公式为: $[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d (F - F_{\min}) / (F_{\max} - F)$ 。其中 K_d 为 Ca^{2+} 结合常数 ($224\text{nmol}/\text{L}$), F 为样本的吸光度 A 值, $F_{\min}$ 和 $F_{\max}$ 分别为 AM 胞浆 Ca^{2+} 的最小和最大释放 A 值。实验数据间比较采用 t 检验。

结 果

1 当归对 LPS 促进肺泡巨噬细胞表达 CD11c 和 CD14 的作用 见表 1。无论加与不加 LPS, 慢支者 AM 膜上 CD11c 和 CD14 表达的百分率均明显高于正常对照者 ($P < 0.05$); 两者的 AM 中加入 LPS 可诱导其 CD11c 的进一步表达 ($P < 0.05$), 但对 CD14 的表

表 1 当归对 LPS 促进肺泡巨噬细胞表达 CD11c 和 CD14 的影响 ($\%, \bar{x} \pm s$)

组别	正常对照者 ($n=10$)		慢支者 ($n=10$)	
	CD11c	CD14	CD11c	CD14
空白对照	16.29 ± 3.78	15.26 ± 5.96	$39.17 \pm 5.56^{\Delta}$	$35.73 \pm 8.05^{\Delta}$
LPS	$24.34 \pm 6.33^*$	19.39 ± 9.54	$47.25 \pm 7.00^{*\Delta}$	$38.91 \pm 8.74^{\Delta}$
当归加 LPS	19.77 ± 4.02	13.99 ± 7.40	$27.61 \pm 8.64^{*\Delta\Delta}$	$26.60 \pm 12.54^{\Delta\Delta}$

注: 与空白对照组比较, $*P < 0.05$; 与 LPS 组比较, $\Delta P < 0.05$; 与正常对照者同项目比较, $\Delta P < 0.05$

达无明显作用,而当归明显抑制 LPS 对慢支者 AM 膜上 CD11c 表达的刺激作用 ($P < 0.05$)。

2 当归对 LPS 促进肺泡巨噬细胞胞浆游离钙升高的作用 见表 2。慢支者 AM 胞浆中基础钙水平较正常对照者明显增高 ($P < 0.05$); LPS 可促进两组的 AM 胞浆游离钙水平升高 ($P < 0.05$),而当归则可抵消 LPS 对 AM 的升钙作用 ($P > 0.05$);在细胞外液无钙时, LPS 仍可促进胞浆游离钙水平的升高 ($P < 0.05$)。

表 2 当归对 LPS 促进肺泡巨噬细胞胞浆游离钙升高的影响 (nmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	正常对照者 ($n=6$)	慢支者 ($n=7$)
基础钙值	99.65 $\pm$ 32.21 [△]	189.47 $\pm$ 23.69 ^{△▲}
LPS	141.15 $\pm$ 20.96 ^{*△}	235.53 $\pm$ 30.30 ^{*△▲}
氯化钙	202.25 $\pm$ 38.84 ^{*△}	228.41 $\pm$ 27.36 ^{*△}
氯化钙加 LPS	265.54 $\pm$ 22.72 [*]	288.47 $\pm$ 43.68 [*]
氯化钙加当归加 LPS	227.85 $\pm$ 43.64 [*]	236.68 $\pm$ 28.60 [*]

注:与基础钙值比较, * $P < 0.05$;与氯化钙加 LPS 组比较, $\Delta P < 0.05$;与正常对照者同项目比较, $\Delta P < 0.05$

讨 论

CD11c/CD18 属于 β_2 整合素家族成员,是由 CD11c 和 CD18 非共价耦联而成的一种跨膜糖蛋白⁽¹⁾。由于 CD18 表达于所有细胞上,故仅通过观察 CD11c 这一特征性亚单位可了解 CD11c/CD18 受体的表达程度。CD11c/CD18 作为 AM 上一种新发现的可与 LPS 结合的受体在气道感染中尤为重要,因为气道内缺乏血清, LPS 可与 AM 膜上 CD11c/CD18 直接结合始动对 AM 的激活。在我们的实验中发现未加 LPS 时,慢支患者 AM 膜上 CD11c 表达明显增加,而且其胞浆游离钙水平也明显升高,提示慢支患者的 AM 相对呈激活状态。由于 AM 的激活又促进其膜上 CD11c 的表达⁽³⁾,进一步促进 LPS 在 AM 内的信号传导,加速 AM 中各种炎性介质的合成分泌,参与慢支气道炎症的发生、发展。

CD14 缺乏跨膜区及胞浆内序列,但在血清蛋白尤其是脂多糖结合蛋白存在下,可由 LPS 刺激其与 CD11b/CD18 形成复合体⁽⁹⁾,进而通过膜上 CD11b/CD18 介导对该细胞的活化及细胞因子释放。实验中我们同样观察到慢支患者 AM 膜上 CD14 的表达增高,提示 CD14 也参与慢支的气道炎症。但与 CD11c/CD18 相比,CD14 在该部位的作用减低。

在单核细胞向巨噬细胞的分化过程中,膜上 CD11b/CD18 表达减低而 CD11c/CD18 表达增高⁽¹⁰⁾。结合 CD14 在局部炎症中作用减低,CD11c/CD18 在

慢支的气道炎症中显得更加重要。CD11c/CD18 和 CD14 在单核细胞—巨噬细胞分化过程中表达量的波动进一步说明这两种膜受体在不同阶段不同部位作用的互补性。

LPS 与 AM 膜上 CD11c/CD18 或 CD14 结合可能通过 G 蛋白的介导快速激活磷脂酶 C (phospholipase C, PLC)⁽¹¹⁾,进而催化分解细胞膜成分磷酸肌醇为激活蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 和动员钙离子的二酰甘油 (diacylglycerol, DAG) 和肌醇三磷酸 (Inositol triphosphate, IP3)。随着胞浆游离钙的增加,钙离子与 PKC 结合,促进其向质膜移位,并与位于质膜上的 DAG 协同作用才能激活 PKC。同时, LPS 也可激活 AM 的蛋白酪氨酸激酶 (protein tyrosine kinase, PTK),其中只有 PTK 家族成员 P53/56lyn 与 CD14 直接相关⁽¹²⁾。无论 PKC 和/或 PTK 的激活最终以蛋白级联反应促进 AM 激活信号的传导及随后炎性介质的合成分泌。而引起胞浆游离钙增加的原因包括胞膜上钙通道的开放和内质网等胞内钙库的释钙。若阻断胞膜上钙通道的情况下, LPS 可通过胞内内质网等胞内钙库的释钙作用引起胞浆游离钙的升高,增加传递 LPS 对巨噬细胞的刺激信号;阻断胞内钙库的释钙途径,细胞膜上的钙通道也被阻断, LPS 的刺激信号将难以传入。本实验发现细胞外液中无论存在钙离子与否, LPS 均可促进 AM 胞浆游离钙水平的升高,进一步证实 LPS 激活 AM 的过程中引起胞浆游离钙增加,包括胞膜上钙通道和胞内钙库的参与。

慢支缓解期气道内存在不同程度的非特异性炎症,与气道局部增多的主要炎症始动细胞—AM 激活有关。两组的 AM 与当归提前孵化后再加 LPS, LPS 诱导 AM 胞浆游离钙增加的作用完全受到抑制,支持当归为一种钙拮抗剂,并提示当归对 LPS 诱导 AM 的激活有抑制作用。与当归提前孵化后再加 LPS 培养的慢支组 AM 膜上 CD11c 的表达明显减低,而 CD11c 的表达与 AM 的激活程度有关⁽³⁾,也支持当归抑制 LPS 对慢支患者 AM 的激活作用。

总之,在慢支患者的气道内,AM 胞膜上的 CD11c/CD18 和 CD14 的表达量发生变化,有助于 AM 参与并始动局部的炎症反应;而当归通过抑制 LPS 诱导慢支患者 AM 胞浆游离钙水平,下调其膜表面 CD11c 的表达,提示当归对于慢支缓解期气道内非特异性炎症可能具有抑制作用。

参 考 文 献

1. Wright SD. CD14 and innate recognition of bacteria. J

- Immunol 1995;155:6—8.
2. Ingalls RR, Golenbock DT. CD11c/CD18, a transmembrane signaling receptor for lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1995; 181:1473—1478.
 3. Bellon T, Lopez-Rodriguez C, Rubio MA, et al. Regulated expression of P150, 95 (CD11c/CD18; α x β 2) and VLA-4 (CD49d/CD29; α 4 β 1) integrins during myeloid cell differentiation. *Eur J Immunol* 1994; 24:41—47.
 4. 李连达. 抗心肌缺血中药研究进展. *中西医结合杂志* 1987; 7(1):57—58.
 5. 支气管肺泡灌洗及灌洗液的细胞计数分类技术规范. *中华结核和呼吸杂志* 1994; 17(1):10—11.
 6. Iwamoto GK, Monick MM, Burmeister LF, et al. Interleukin-1 by human alveolar macrophages and blood monocytes. *Am J Physiol* 1989; 256(cell physiol 25):C1012—1015.
 7. 梁亚明, 舒昌达. 当归对链脲佐菌素糖尿病小鼠腹腔巨噬细胞受损吞噬功能的影响. *中国中西医结合杂志* 1992; 12(2): 101—102.
 8. Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985; 260(6):3440—3450.
 9. Zarewych DM, Kindzelskii AL, Todd III RF, et al. LPS induces CD14 association with complement receptor type 3, which is reversed by neutrophil adhesion. *J Immunol* 1996; 156:430.
 10. Bilsland CAG, Diamond MS, Springer TA. The leukocyte integrin P150, 95 (CD11c/CD18) as a receptor for iC3b: Activation by a heterologous β subunit and localization of a ligand recognition site to the I domain. *J Immunol* 1994; 152: 4587.
 11. Alonso TSR, Trautmann A. Calcium responses elicited by nucleotides in macrophages. Interaction between two receptor subtypes. *J Biol Chem* 1993; 268:18640—18647.
 12. Shapira L, Takashiba S, Champagne C, et al. Involvement of protein kinase C and protein tyrosine kinase in lipopolysaccharide-induced TNF- α and IL-1 β production by human monocytes. *J Immunol* 1994; 153:1818—1823.

(收稿:1998-09-28 修回:1999-01-22)

烧伤 V 号治疗中小面积烧伤 500 例

陈维公

1989~1997 年,笔者采用自拟烧伤 V 号治疗中小面积烧伤 500 例,取得满意疗效。现报告如下。

临床资料 500 例烧伤患者中,男性 289 例,女性 211 例,年龄 1~85 岁。烧(烫)伤性质:火焰烧伤 98 例,石炭烧伤 5 例,硫酸烧伤 2 例,热液(油)烫伤 377 例,电烧伤 18 例。烧伤面积(按新九分法计算):1%~5% 260 例,6%~10% 94 例,11%~30% 110 例,31%~47% 30 例,50%~70% 6 例。合并症:合并呼吸道烧伤 4 例,脑水肿 2 例,败血症 3 例,合并疟疾 2 例。烧伤程度(按三度四分法判定):I 度烧伤没有统计,浅 II 度创面 270 例,深 II 度创面 176 例,III 度创面 44 例。其中新鲜创面 392 例,感染创面 106 例。部位:头、面、颈部烧伤 62 例,手 115 例,脚 42 例,会阴部 2 例,四肢部 182 例,胸背部烧伤 97 例。(注:三度四分法、新九分法是参照安徽省蚌埠市第三人民医院烧伤科的方法)

治疗方法 烧伤 V 号液由古松皮 1000g 忍冬藤 1000g 野菊花 1000g 大黄 1000g 硫酸镁 150g 冰片 15g 组成。制法:将古松皮、忍冬藤、野菊花、大黄炒成焦黄色加入醋,醋与药之比 100:10,炒干,加入水煮沸,水与药之比 4:1,滤去药渣加入硫酸镁、冰片,拌匀装瓶高压消毒。各类创面均以先包扎、后半暴露。创面清创消毒后,剪破水泡,使泡内液体流尽,无菌生理盐水冲洗干净,无菌纱布浸于烧伤 V 号液中湿敷于创面,厚敷料包扎,1 日换药 1 次。当创面进入修复期,肉芽组织生长好,伤后 1 周开始行半暴露疗法,直接向创面油敷料喷烧伤 V

号液,每日 2 次;对焦痂较厚,坏死组织和正常组织难以分离应逐步清除,污染较大的创面,应在基础麻醉下行彻底清创,行烧伤 V 号液油敷料湿敷,烧伤创面愈合,油敷料与组织分离,即告烧伤创面愈合。在治疗中有脱水指征者,按烧伤补液公式给予补液,有明显全身感染症状者可予全身抗感染治疗。

结 果

1 治愈标准 浅 II 度烧伤表皮愈合后,创面红润光滑,不影响毛发生长,无疤痕、无痒感。深 II 度烧伤边缘蔓延愈合,愈合皮肤呈红褐色,皮肤弹性稍差。III 度烧伤治疗 10 天左右已有肉芽组织新生,按常规予植皮后,皮瓣扩散愈合。

2 治疗结果 500 例中治愈 497 例,转院 2 例,死亡 1 例,浅 II 度烧伤 5~20 天,平均 12.5 天;深 II 度烧伤 8~28 天,平均 18 天;III 度烧伤 14~45 天,平均 24.5 天。愈后有疤痕者,经用自拟烧伤疤痕液浸浴外擦,疤痕组织转化吸收。但 III 度烧伤 20 例,虽经反复细致的换药,但愈后皮肤弹性差,痒感重。

讨 论 烧伤 V 号具有消炎止痛、抗渗出作用。烧伤后创面疼痛,体液外渗,毒素内侵。药中古松皮有燥湿,生肌止痛,收敛之功;野菊花、忍冬藤清热解毒凉血;大黄凉血解毒,活血化瘀;冰片止痛;硫酸镁解痉。全方配伍活血祛瘀、消肿止痛、生肌祛腐。烧伤 V 号液治疗烧伤还处在探索阶段,治疗例数少,有待于以后工作中进一步总结和提高。

(收稿:1998-02-23 修回:1998-12-23)