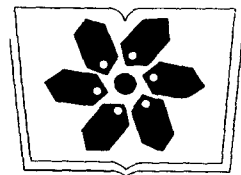


147 H2



中国科学院科学出版基金资助出版

# 休克的细胞和分子基础

赵克森 金丽娟 主编



A0966988

科学出版社

2002

## 内 容 简 介

本书从休克血管通透性变化、血管反应性变化、休克时体液因子和细胞信号转导、休克多器官功能不全、休克治疗的基础研究等方面阐明了重症休克的发生机制,为重症难治性休克奠定了诊治基础,反应了国内外休克研究的最新进展,特别是反应了作者所在单位全军休克微循环重点实验室 18 年来的研究成果。

本书既可作为医学、生物学研究生教材,又可供临床医生和有关生物学研究工作者参考。

### 图书在版编目(CIP)数据

休克的细胞和分子基础/赵克森,金丽娟主编. —北京:科学出版社,2002

ISBN 7-03-010297-5

I. 休… II. ①赵… ②金… III. 休克-病理-研究 IV. R364.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2002) 第 017799 号

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

http: //www. sciencep. com

源海印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2002 年 5 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2002 年 5 月第一次印刷 印张: 22 1/4

印数: 1—3 000 字数: 507 000

定价: 40.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈新欣〉)

## 前 言

自 1743 年法国医生 Henri Francois Le Dran 第一个在论文中描述休克 (希腊文 choc) 以来,二个多世纪过去了。经过了 250 多年的研究,对休克的认识已从一组严重临床状态的判定和救治,逐步深入到它的本质。随着医学生物学的进展,特别是经历了多次国际上的重大战争,休克的研究抢救了千千万万个濒临死亡的伤病员。然而进入 21 世纪的今天,在采用各种抗休克措施以后,部分重症病人仍然摆脱不了灭顶之灾。这种重症难治性休克状态 (irreversible shock state) 成为当前休克研究的中心议题。在探讨这个医学难题时,若干发病学疑问一直困扰着医学界。例如,为什么重症休克时采用各种升压药物和抗休克措施后血压仍然持续下降?为什么感染性休克和其他晚期休克的病死率居高不下,有什么办法同时拮抗近年来发现的越来越多的细胞因子和其他体液因子?为什么烧伤性休克血管通透性增高和体液丢失在医学界早已尽人皆知,但至今仍然只能根据烧伤深度和面积进行补液,而没有找到一个降低通透性和减少输液的有效措施?等等。它牵涉到血管反应性、血管通透性、细胞流变学、细胞信号转导、细胞因子表达等一系列休克发病机制。近年来随着细胞生物学和分子生物学的进展,在这方面积累了一些有价值的科学资料,虽然问题尚未完全阐明,但为重症休克的诊治提供了良好基础。

全军休克微循环重点实验室自 1984 年建室以来,对休克发生的若干问题进行了系列的研究,培养了一批硕士、博士、博士后人才。以本室 18 年的研究为基础,结合近年来休克研究的文献资料,由一批博士为主力,编写了这本休克专著。休克的基础内容涉及面很广,本书不可能面面俱到,而以我们从事的工作和熟悉的内容作为取舍的基本原则。即使这样,仍然免不了出现各种不足,甚至差错,有待再版时修正。本书的出版得到中国科学院出版基金的资助,并得到科学出版社综合出版中心马素卿编辑的大力协助,在此一并致谢。

赵克森 金丽娟

2002 年 1 月于广州

# 目 录

|                                         |           |
|-----------------------------------------|-----------|
| <b>第一章 休克时血液细胞流变学变化 .....</b>           | <b>1</b>  |
| <b>第一节 白细胞与休克 .....</b>                 | <b>2</b>  |
| 一、白细胞的基本特性 .....                        | 2         |
| 二、休克时白细胞在毛细血管被扣押现象 .....                | 3         |
| 三、休克时白细胞在微静脉附壁黏着 .....                  | 7         |
| 四、血管内皮细胞与白细胞贴壁黏着 .....                  | 14        |
| 五、白细胞对休克组织的损伤作用 .....                   | 16        |
| <b>第二节 红细胞与休克 .....</b>                 | <b>20</b> |
| 一、红细胞的基本特性 .....                        | 20        |
| 二、休克时红细胞变形性变化 .....                     | 22        |
| 三、休克时红细胞聚集和血液黏度变化 .....                 | 25        |
| <b>第三节 血小板与休克 .....</b>                 | <b>28</b> |
| 一、血小板的基本特性 .....                        | 28        |
| 二、休克时血小板聚集 .....                        | 30        |
| 三、休克时微血栓形成 .....                        | 33        |
| <b>第二章 休克时血管通透性的变化 .....</b>            | <b>38</b> |
| <b>第一节 与血管通透性有关的细胞结构基础 .....</b>        | <b>39</b> |
| 一、内皮细胞 .....                            | 39        |
| 二、周细胞 .....                             | 52        |
| 三、内皮细胞的基底膜 .....                        | 54        |
| <b>第二节 血管通透性变化的信号转导机制 .....</b>         | <b>54</b> |
| 一、引起血管通透性变化的主要信号 .....                  | 55        |
| 二、参与调节内皮屏障功能的内皮细胞受体 .....               | 58        |
| 三、参与调节内皮屏障功能的信号通路 .....                 | 59        |
| <b>第三节 休克时血管通透性的变化及其机制 .....</b>        | <b>66</b> |
| 一、休克时内皮细胞的器质性改变 .....                   | 66        |
| 二、血管通透性变化对休克的影响及其机制 .....               | 67        |
| 三、特殊器官血管通透性的特点及其在休克和全身炎症反应综合征中的作用 ..... | 71        |
| <b>第四节 内皮细胞屏障功能和血管通透性研究的方法 .....</b>    | <b>75</b> |
| 一、内皮细胞的培养及屏障功能研究 .....                  | 75        |
| 二、用分离灌流微静脉测定微血管通透性的方法 .....             | 77        |

|                               |     |
|-------------------------------|-----|
| <b>第三章 休克时血管反应性变化</b> .....   | 82  |
| 第一节 血管的一般特性及其功能调节 .....       | 83  |
| 一、动脉血管的功能和调节 .....            | 83  |
| 二、微循环及其功能 .....               | 84  |
| 第二节 血管平滑肌细胞的收缩和舒张及其机制 .....   | 85  |
| 一、血管平滑肌细胞收缩 .....             | 85  |
| 二、血管平滑肌的舒张 .....              | 90  |
| 第三节 休克时血管反应性变化 .....          | 93  |
| 一、局部代谢产物的积聚和细胞内酸中毒 .....      | 93  |
| 二、肾上腺素能受体失敏与休克的血管反应性 .....    | 96  |
| 三、血管平滑肌细胞膜超极化与休克的血管反应性 .....  | 100 |
| 四、一氧化氮与休克的血管反应性 .....         | 114 |
| 五、血管反应性恢复剂——治疗休克的新思路 .....    | 115 |
| <b>第四章 休克与细胞信号转导</b> .....    | 120 |
| 第一节 细胞信号的种类 .....             | 122 |
| 一、物理信号 .....                  | 122 |
| 二、化学信号 .....                  | 123 |
| 三、生物信号 .....                  | 124 |
| 第二节 信号转导受体的分类 .....           | 124 |
| 一、跨膜受体 .....                  | 125 |
| 二、G 蛋白偶联受体 .....              | 126 |
| 三、细胞内受体 .....                 | 127 |
| 第三节 细胞内信号分子 .....             | 128 |
| 一、G 蛋白 .....                  | 128 |
| 二、联结蛋白 .....                  | 129 |
| 三、第二信使 .....                  | 132 |
| 四、非受体蛋白酪氨酸激酶 .....            | 134 |
| 五、丝裂原活化蛋白激酶 .....             | 135 |
| 六、蛋白激酶 C .....                | 137 |
| 七、蛋白激酶 A .....                | 139 |
| 八、蛋白激酶 G .....                | 139 |
| 九、信号转导中的磷脂酶和磷脂 .....          | 140 |
| 十、磷酸酶 .....                   | 141 |
| 第四节 休克过程的信号转导调控 .....         | 142 |
| 一、LPS 通过 CD14 依赖性机制激活细胞 ..... | 143 |
| 二、TLR4 及其介导的细胞信号 .....        | 144 |
| 三、内毒素休克过程中 MAPK 通路的激活 .....   | 147 |
| 四、PKC 通路内毒素休克过程中的作用 .....     | 150 |
| 五、内毒素休克过程中 Src 家族激酶的激活 .....  | 150 |

|                                     |            |
|-------------------------------------|------------|
| 六、内毒素休克过程中 NF- $\kappa$ B 的激活 ..... | 151        |
| 七、致炎细胞因子的作用 .....                   | 152        |
| 八、LPS 激活内皮细胞引起通透性增加的分子机制 .....      | 155        |
| 九、LPS 的其他作用 .....                   | 155        |
| <b>第五章 休克与体液因子作用 .....</b>          | <b>159</b> |
| 第一节 细胞黏附和黏附分子 .....                 | 159        |
| 一、血管内细胞黏附的特点 .....                  | 160        |
| 二、血管内细胞的黏附和信号传递 .....               | 162        |
| 三、基因剔除技术在血管黏附分子研究中的作用 .....         | 163        |
| 四、黏附分子的种类和性质 .....                  | 164        |
| 第二节 一氧化氮与休克 .....                   | 178        |
| 一、一氧化氮的生化特点 .....                   | 178        |
| 二、一氧化氮合酶表达的调控 .....                 | 180        |
| 三、一氧化氮在休克中的作用 .....                 | 186        |
| 第三节 自由基与休克 .....                    | 195        |
| 一、自由基的生物学基础 .....                   | 195        |
| 二、自由基在休克过程中的作用 .....                | 201        |
| <b>第六章 休克与转录因子 .....</b>            | <b>214</b> |
| 第一节 核因子 $\kappa$ B .....            | 215        |
| 一、NF- $\kappa$ B 的分子生物学特性 .....     | 216        |
| 二、I $\kappa$ B 的分子生物学特性 .....       | 217        |
| 三、I $\kappa$ K 的分子生物学特性 .....       | 218        |
| 四、NF- $\kappa$ B 的信号转导 .....        | 219        |
| 五、NF- $\kappa$ B 的生物学功能 .....       | 220        |
| 六、NF- $\kappa$ B 的抑制剂 .....         | 221        |
| 第二节 激活子蛋白-1 .....                   | 223        |
| 一、AP-1 的组成 .....                    | 223        |
| 二、AP-1 的信号转导 .....                  | 224        |
| 第三节 信号转导和转录激活子 .....                | 226        |
| 一、STAT 的分子生物学特性 .....               | 226        |
| 二、STAT 的信号转导 .....                  | 227        |
| 三、STAT 的生物学功能 .....                 | 228        |
| 第四节 热休克因子 .....                     | 229        |
| 一、HSF 的分子生物学特性 .....                | 229        |
| 二、HSF 的信号转导 .....                   | 230        |
| 三、HSF 的生物学功能 .....                  | 230        |
| 第五节 其他转录因子 .....                    | 232        |
| 一、ATF2 .....                        | 232        |
| 二、Elk-1 .....                       | 233        |

|                                      |            |
|--------------------------------------|------------|
| 三、CHOP .....                         | 233        |
| 四、MEF2 .....                         | 233        |
| 五、CREB .....                         | 234        |
| 六、Egr-1 .....                        | 234        |
| <b>第七章 休克时的免疫功能变化 .....</b>          | <b>237</b> |
| 第一节 免疫学基础理论 .....                    | 237        |
| 一、非特异性免疫反应 .....                     | 238        |
| 二、特异性免疫反应 .....                      | 239        |
| 第二节 休克时的免疫功能变化 .....                 | 241        |
| 一、淋巴细胞 .....                         | 241        |
| 二、巨噬细胞 .....                         | 242        |
| 三、吞噬细胞 .....                         | 243        |
| 四、补体系统 .....                         | 244        |
| 第三节 休克后免疫功能紊乱的机制 .....               | 245        |
| 一、缺血、缺氧对免疫功能的影响 .....                | 245        |
| 二、神经内分泌免疫调节网络紊乱 .....                | 246        |
| 三、内毒素 .....                          | 247        |
| <b>第八章 休克与细胞凋亡 .....</b>             | <b>254</b> |
| 第一节 细胞凋亡的基础 .....                    | 255        |
| 一、细胞凋亡的概念 .....                      | 255        |
| 二、细胞凋亡的特征 .....                      | 255        |
| 三、细胞凋亡的检测方法 .....                    | 257        |
| 四、caspase 家族蛋白酶——细胞凋亡的执行器 .....      | 261        |
| 五、细胞凋亡的调控蛋白 .....                    | 263        |
| 六、细胞凋亡信号传导通路 .....                   | 264        |
| 第二节 休克与细胞凋亡 .....                    | 271        |
| 一、烧伤休克与细胞凋亡 .....                    | 271        |
| 二、创伤与细胞凋亡 .....                      | 273        |
| 三、脓毒症休克与细胞凋亡 .....                   | 275        |
| 四、细胞凋亡在损伤、炎症中的积极意义 .....             | 278        |
| 五、休克时细胞凋亡的防治 .....                   | 279        |
| <b>第九章 多器官功能不全综合征中细胞凋亡及其调控 .....</b> | <b>282</b> |
| 第一节 细胞凋亡在 MODS 发生发展中的作用 .....        | 283        |
| 一、MODS 发生过程中存在细胞凋亡 .....             | 283        |
| 二、细胞凋亡与细胞坏死 .....                    | 287        |
| 三、细胞凋亡在 MODS 发生中的意义 .....            | 289        |
| 第二节 MODS 时细胞凋亡的诱导因素 .....            | 290        |
| 一、氧化应激 .....                         | 290        |

|                             |            |
|-----------------------------|------------|
| 二、细胞因子 .....                | 290        |
| 三、缺血-再灌注损伤 .....            | 292        |
| 第三节 MODS 时细胞凋亡的调控 .....     | 292        |
| 一、细胞内信号转导 .....             | 292        |
| 二、基因表达的改变 .....             | 297        |
| 第四节 MODS 时凋亡细胞的清除 .....     | 299        |
| 一、MODS 早期吞噬细胞清除功能活跃 .....   | 299        |
| 二、严重创伤时巨噬细胞清除能力下降 .....     | 299        |
| 三、凋亡细胞的清除机制 .....           | 301        |
| <b>第十章 休克治疗的基础研究 .....</b>  | <b>305</b> |
| 第一节 休克的补液扩容问题 .....         | 306        |
| 一、补液量的判断 .....              | 306        |
| 二、扩容治疗时输液种类的选择 .....        | 308        |
| 三、输血与血液代用品 .....            | 310        |
| 第二节 血管活性药物的应用 .....         | 311        |
| 一、常用的血管活性药 .....            | 311        |
| 二、血管活性药物使用的注意事项 .....       | 312        |
| 第三节 休克时的细胞保护与氧自由基清除 .....   | 313        |
| 一、细胞保护的概念 .....             | 313        |
| 二、细胞保护剂的作用 .....            | 313        |
| 三、氧自由基清除与休克细胞保护 .....       | 314        |
| 第四节 休克有关的炎性细胞因子及其抗炎治疗 ..... | 315        |
| 一、休克时主要炎性细胞因子 .....         | 315        |
| 二、休克时的抗炎治疗措施 .....          | 317        |
| 第五节 黏附分子单抗在休克防治中的作用 .....   | 318        |
| 一、ICAM-1 单抗的作用 .....        | 318        |
| 二、LFA-1 单抗的作用 .....         | 318        |
| 第六节 虎杖甙的抗休克作用及其分子机制 .....   | 319        |
| 一、虎杖甙的性质与结构 .....           | 319        |
| 二、虎杖甙的动物实验研究 .....          | 319        |
| 三、虎杖甙抗休克作用的分子机制 .....       | 320        |
| 第七节 休克晚期血管反应性低下的防治 .....    | 323        |
| 英文缩略词索引 .....               | 327        |
| 中文关键词索引 .....               | 333        |

# 第一章 休克时血液细胞流变学变化

|                            |    |                                |    |
|----------------------------|----|--------------------------------|----|
| <b>第一节 白细胞与休克</b> .....    | 2  | <b>二、休克时红细胞变形性变化</b> .....     | 22 |
| 一、白细胞的基本特性 .....           | 2  | (一) 休克时红细胞变形力下降及其影响 .....      | 22 |
| 二、休克时白细胞在毛细血管被扣押现象 .....   | 3  | (二) 休克时红细胞变形性下降的机制 .....       | 23 |
| (一) 正常情况下白细胞在肺脏的贮备现象 ..... | 3  | <b>三、休克时红细胞聚集和血液黏度变化</b> ..... | 25 |
| (二) 病理情况下白细胞的扣押现象 .....    | 4  | (一) 红细胞聚集和血液黏度升高 .....         | 25 |
| 三、休克时白细胞在微静脉附壁黏着 .....     | 7  | (二) 血液过度稀释和低黏血症 .....          | 26 |
| (一) 白细胞在微静脉黏附现象 .....      | 7  | <b>第三节 血小板与休克</b> .....        | 28 |
| (二) 选择蛋白家族和白细胞附壁滚动 .....   | 8  | 一、血小板的基本特性 .....               | 28 |
| (三) 整合蛋白家族和白细胞贴壁黏着 .....   | 11 | 二、休克时血小板聚集 .....               | 30 |
| 四、血管内皮细胞与白细胞贴壁黏着 .....     | 14 | (一) 休克时血液和器官中血小板聚集 .....       | 30 |
| (一) 血管内皮黏附蛋白的表达反应 .....    | 14 | (二) 休克时血小板聚集的发生机制 .....        | 31 |
| (二) 微静脉内皮细胞表型的作用 .....     | 15 | (三) 休克时血小板聚集的实验治疗 .....        | 32 |
| 五、白细胞对休克组织的损伤作用 .....      | 16 | <b>三、休克时微血栓形成</b> .....        | 33 |
| (一) 微循环灌流障碍 .....          | 16 | (一) 休克、SIRS、MODS 时的微血栓形成 ..... | 33 |
| (二) 实质细胞的损害 .....          | 18 | (二) 休克时微血栓形成的发生机制 .....        | 33 |
| <b>第二节 红细胞与休克</b> .....    | 20 |                                |    |
| 一、红细胞的基本特性 .....           | 20 |                                |    |

血液细胞流变学是研究血液细胞变形和流动的一门科学。在 20 世纪 70 年代,随着细胞生物学发展,建立了激光共聚焦显微镜 (laser confocal microscopy)、微吸管、液流室 (flow chamber)、激光衍射仪 (ektacytometer) 等技术,对单个细胞的流变学特性进行了比较深入的研究;20 世纪末随着分子生物技术和纳米技术的发展,建立了基因重组和表达、转基因和基因剔除等技术,研制了原子力显微镜 (atomic force microscope)、磁力显微镜 (magnetic force microscope)、近场显微镜 (near-field microscope),使流变学研究进入分子水平。血液细胞流变学的研究丰富了休克的发病机制,并为休克的治疗提出了新的思路。

## 第一节 白细胞与休克

### 一、白细胞的基本特性

白细胞外观为圆形,细胞直径为  $8.3\mu\text{m}$ , 体积为  $182\mu\text{m}^3$ 。在扫描电镜下可见中性粒细胞表面呈皱褶状(图 1-1), 有相当于球形表面两倍的过剩的细胞膜, 这种皱褶状过剩的表面允许细胞可以变形伸长, 不会牵拉细胞的磷脂膜。中性粒细胞中细胞核占容积 20%, 颗粒占 15%, 其他为结构蛋白和水。水也是胞核和颗粒的主要组成部分, 水占细胞容积的 77%; 结构蛋白成分主要为细胞骨架, 包括肌动蛋白微丝、微管、中间丝。肌动蛋白是主要的结构蛋白, 以纤维状 F-肌动蛋白和球状 G-肌动蛋白两种形式存在。F-肌动蛋白直径为  $8\mu\text{m}$ , 长度为  $1\mu\text{m}$ 。微管为直径  $25\mu\text{m}$  的中空管, 由微管蛋白组成, 在邻近胞核区域向细胞膜放射状排列。中间丝直径  $10\mu\text{m}$  介于微管和微丝之间, 因而命名。上述蛋白构成了细胞的支架, 故名细胞骨架, 参与物质运输、信息传导、及细胞变形等作用。



图 1-1 扫描电镜下的白细胞 (引自 Robert M, 1995)

可见白细胞表面呈皱褶状, 它为白细胞变形提供了一定贮备的细胞膜。

左: 中性粒细胞, 中: 单核细胞, 右: 淋巴细胞。

白细胞与红细胞相比, 它具有细胞核, 体积比红细胞大 2 倍以上, 胞浆黏度高 200 倍, 硬度高 2000 倍。在通过直径  $4\sim 6\mu\text{m}$  的毛细血管时, 它不能像红细胞那样发生折叠弯曲, 只能以较慢的速度呈现长柱状变形通过毛细血管, 且与内皮有一定的黏着力(表 1-1)。正常情况下, 白细胞通过毛细血管需  $0.5\sim 3.0$  秒, 使血流有短暂的停顿, 平均停顿时间为 0.24 秒, 但正常时并不发生白细胞嵌塞和血流完全停止。

表 1-1 红细胞和白细胞流变学特性

|       | 单位                       | 红细胞              | 白细胞      |
|-------|--------------------------|------------------|----------|
| 体积    | $\mu\text{m}^3$          | 88~92            | 182      |
| 硬度    | $\text{dyn}/\text{cm}^2$ | 0.1              | 180~300  |
| 胞浆黏度  | hP                       | 6                | 1300     |
| 内皮黏着力 | $\text{dyn}/\text{cm}^2$ | 0                | 500~1000 |
| 平均大小  | $\mu\text{m}$            | $2\times 8$ (盘形) | 8.2 (圆形) |
| 变形方式  |                          | 折叠弯曲             | 长柱状      |

## 二、休克时白细胞在毛细血管被扣押现象

### (一) 正常情况下白细胞在肺脏的贮备现象

正常肺脏的毛细血管中中性粒细胞的浓度比大血管中高 45~60 倍,形成了白细胞的边缘池或贮备池 (marginated pool of neutrophil)。它为创伤、感染、炎症、应激等情况下白细胞被重新招募 (recruitment) 作准备。正常肺毛细血管中白细胞浓度增加主要是由于中性粒细胞的力学特征和肺毛细血管的结构特点所决定,它们共同导致白细胞变形速度减慢,通过肺毛细血管时间延长;而已知的黏附分子并不参与正常白细胞贮备现象 (leukocyte margination) 的发生。

肺毛细血管是由许多短的毛细血管节段 (capillary segment) 所组成,它们构成一个复杂的相互沟通的网络。从微动脉到微静脉之间包括有 40~100 个毛细血管段,涵盖 8~17 个肺泡壁 (表 1-2)。肺毛细血管段的直径粗细不一,为 2~15 $\mu\text{m}$ ,而白细胞直径为 8~10 $\mu\text{m}$ ,因此,至少有 40%~60% 的毛细血管段白细胞需要变形才能通过。白细胞在微动脉中接近球形,形状因子 (shape factor) 为  $1.1 \pm 0.1$ ,而在毛细血管中它为长柱形,形状因子为  $1.5 \pm 0.2$ 。红细胞可以折叠弯曲,较快的通过毛细血管网;白细胞呈长柱状变形,也能较快地使直径变为 5.0~5.5 $\mu\text{m}$ ,但要进一步变小通过狭窄的毛细血管节段连接部,则需要很长的时间。白细胞通过肺毛细血管的时间为 26 秒,而红细胞只有 1.4~4.2 秒;白细胞不仅通过缓慢,而且在通过狭窄部位时移动会暂停,需要时间等待进一步变形。假设两种细胞以同一浓度进入毛细血管网,其中一种细胞比另一种细胞需要更多的时间通过该网,这种细胞在网中的浓度必然会高于另一种。

表 1-2 肺毛细血管床和白细胞结构的特点

|                      |                    |
|----------------------|--------------------|
| 中性粒细胞直径              | 8~10 $\mu\text{m}$ |
| 肺毛细血管节段直径            | 2~15 $\mu\text{m}$ |
| 在一条通路上毛细血管节段数目       | 40~100 个           |
| PMN 通过毛细血管时间         | 26 秒               |
| RBC 通过毛细血管时间         | 1.4~4.2 秒          |
| 通过时间长于 RBC 的白细胞所占百分数 | 78%~87%            |
| 停止于毛细血管一次以上白细胞所占百分数  | 35%~50%            |
| 肺毛细血管中白细胞浓度          | 为大血管 45~60 倍       |
| 肺毛细血管中 PMN 的形状因子     | $1.5 \pm 0.2$      |

正常肺毛细血管中并不出现白细胞滚动现象, L-选择蛋白缺乏的小鼠有正常的白细胞贮备池,而正常的肺毛细血管内皮并不表达 P-选择蛋白和 E-选择蛋白。CD11/CD18 缺乏的狗白细胞通过肺微循环的时间正常,注射 CD18 抗体并不能增加循环中的白细胞数。两例 CD11/CD18 缺乏的儿童 (白细胞黏附缺陷症 LAD I 型) 在注射去甲肾上腺素后,循环中白细胞数增多,说明微循环有正常的白细胞贮备池。上述资料均提示已知的黏附分子并不介导正常肺的白细胞贮备现象发生。

## (二) 病理情况下白细胞的扣押现象

失血、感染、休克、再灌注损伤等情况下出现白细胞扣押和嵌塞毛细血管的现象 (leukocyte sequestration and plugging in capillary)。它不仅见于肺脏, 亦出现于肌肉、心、脑等器官, 参与休克时无复流 (no-reflow) 现象和多器官功能不全 (MODS) 的发生。笔者曾报告, 重症失血性休克大鼠骨骼肌中白细胞嵌塞毛细血管, 能否消除这种嵌塞和使毛细血管重新开放是影响动物存活的重要因素。图 1-2 显示中性粒细胞嵌塞于毛细血管的力学分析示意图。 $P_1$  和  $P_2$  分别为推动和阻止白细胞流动的压力,  $\delta$  为白细胞与内皮细胞之间黏着切应力,  $L$  为白细胞与内皮细胞接触的长度。从力学角度分析, 当白细胞嵌塞于毛细血管时, 推动白细胞流动的力量至少应该与阻止白细胞流动的力量相当。

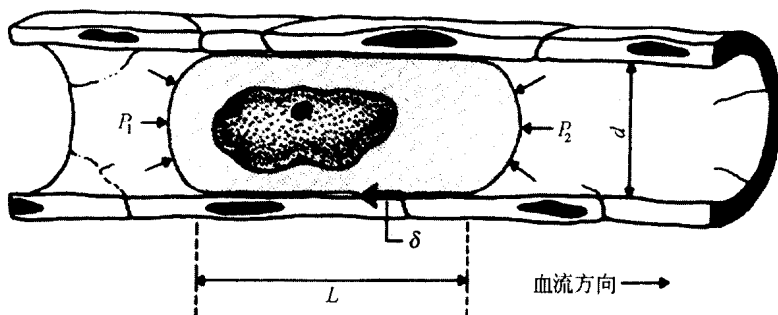


图 1-2 中性粒细胞嵌塞于毛细血管的力学分析示意图 (引自 Engler RL, 1995)

$P_1, P_2$ : 白细胞两侧压力,  $\delta$ : 白细胞和内皮细胞黏着切应力,

$L$ : 白细胞和内皮细胞接触的长度,  $d$ : 毛细血管直径。

$$P_1 \pi R^2 = P_2 \pi R^2 + \delta_2 \pi R L$$

$$P_1 \pi R^2 - P_2 \pi R^2 = \delta_2 \pi R L \cdots \cdots 1 \text{ 式}$$

以  $\Delta P$  代表压力降, 即  $\Delta P = P_1 - P_2$ , 代入 1 式

$$\Delta P \pi R^2 = \delta_2 \pi R L$$

$$\Delta P = \delta_2 L / R \cdots \cdots 2 \text{ 式}$$

由 2 式可见, 压力降 ( $\Delta P$ )、黏着应力 ( $\delta$ )、白细胞长度 ( $L$ )、毛细血管半径 ( $R$ ) 四个因素参与了白细胞嵌塞的发生。在休克时的变化如下。

### 1. 白细胞变形能力下降

白细胞变形能力影响着白细胞在毛细血管中的长度 ( $L$ )。白细胞变形性下降是白细胞扣押初始过程 (initial events of neutrophil sequestration) 发生的重要因素。表现为变形能力下降, 硬度增大, 白细胞体积变大和变圆。白细胞介素 8 (IL-8)、趋化寡肽 (fMLP)、C5a 等炎性介质在家兔血管内注射 1 分钟后, 可见外周血中白细胞明显减少, PMN 扣留于肺脏。扣留于家兔肺部的白细胞变得更大更圆。离体实验证明, 上述炎症介质与白细胞膜相应受体结合, 在 0.5~2.0 分钟内, 使微丝的肌动蛋白单体 (G-

肌动蛋白)发生聚合,形成纤维状F-肌动蛋白,在胞浆膜下形成一个壳状物,从而使白细胞体积增加,变形能力下降,细胞硬度增大。上述变化可被微丝组装的抑制剂细胞松弛素B(cytochalasin B)所抑制。整体实验证实,事先注射细胞松弛素D可防止fMLP引起的中性粒细胞在肺部的扣留。白细胞变形力和力学特性的变化导致了白细胞扣押初始过程的发生,此时并不需要黏附蛋白(整合蛋白、选择蛋白)的参与。但这种变化延长了白细胞通过毛细血管的时间,为后续的事件创造了条件。目前尚未阐明,炎性介质的刺激通过什么信号转导途径,可以如此迅速地引起细胞骨架重排,带来白细胞变形能力的下降。上述研究侧重于感染、炎症等病理情况下,休克时的变化也尚待进一步确定。

## 2. 毛细血管灌流压降低

正常情况下,须推动白细胞运动和解除毛细血管中白细胞嵌塞的压力降( $\Delta P$ )约为0.7kPa(5.3mmHg),而正常毛细血管中(如心肌中)的 $\Delta P$ 可达1.33kPa(10mmHg)。因此在正常情况下,白细胞进入毛细血管的血流可有短暂停顿,但并不发生嵌塞和扣押的情况。

休克时阻碍白细胞流动的黏附力增高;而随着血压下降,驱动白细胞流动的灌流压又逐渐降低,从而带来白细胞在毛细血管中嵌塞和扣押。在家兔股薄肌微循环查明,正常每平方毫米可见38根毛细血管。在失血性休克4小时,当动脉灌流压在3.6~9.6kPa(27~72mmHg)时,滞留白细胞数为4~8个/mm<sup>2</sup>;当灌流压降至2.67kPa(20mmHg)以下时,毛细管中白细胞滞留数增至16~21个/mm<sup>2</sup>;当重灌流压力增至3.6kPa以上时,滞留白细胞数又降至4~5个/mm<sup>2</sup>。结论是在休克、重灌流损伤时,毛细血管白细胞的滞留是压力相关现象,不是受体依赖现象,早期恢复灌流压可使其消除。

笔者曾报告,休克时在解除白细胞嵌塞和使毛细血管重新开放中,恢复脉压( $PP$ )和脉动血流在毛细血管开口处的出现有重要的意义。在失血性休克后1小时,大鼠肌肉中多数毛细血管已完全关闭。注入中药虎杖甙(Polygonum cuspidatum, PC)后,平均动脉压( $MAP$ )仅有中度回升:由5.1~5.6kPa(38~42mmHg)升至8.6±0.4kPa(64.7±3.4mmHg),但脉压上升达3.1±0.3kPa(23.1±2.5mmHg),超过了失血前水平2.5±0.1kPa(18.5±1.0mmHg)。此时用双摄像机同步录像,见毛细血管自微动脉分支部出现与脉压同步的脉动血流,它最终可冲走停滞的白细胞,使毛细血管重新开放和灌流。盐水(NS)组注入相同量(0.6ml)生理盐水,无明显脉动血流出现,多数毛细血管仍然关闭(表1-3)。在给药和输血后观察的2小时内,毛细血管血流一直保持的动物存活在24小时以上,而血流不能保持的动物多数死亡,因此毛细血管开放与动物存活密切相关。

## 3. 毛细血管管腔狭窄

毛细血管口径( $R$ )是影响白细胞扣押的另一个重要因素。正常毛细血管狭窄的部位是毛细血管从微动脉分支入口处和毛细血管内皮细胞核隆起突向管腔部位。病理情况下,内皮细胞可以发生肿胀,甚至突向管腔。在炎症时可有内皮细胞小泡(bleb)形成;在缺

表 1-3 脉压对失血性休克毛细血管开放的影响

|             | 失血前        |            | 失血后 1h    |           | 给药后 10min |             |
|-------------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|-------------|
|             | NS 组       | PC 组       | NS 组      | PC 组      | NS 组      | PC 组        |
| MAP (kPa)   | 16.05±0.28 | 17.44±0.49 | 5.29±0.05 | 5.28±0.05 | 7.43±0.37 | 8.62±0.45   |
| PP (kPa)    | 2.51±0.36  | 2.46±0.13  | 1.39±0.15 | 1.21±0.17 | 1.97±0.18 | 3.08±0.37 * |
| 毛细血管开放 (例数) |            |            |           |           |           |             |
| —           | 0          | 0          | 11        | 13        | 10        | 0           |
| +           | 0          | 0          | 1         | 3         | 2         | 4           |
| ++          | 0          | 0          | 0         | 0         | 0         | 11 * *      |
| +++         | 12         | 16         | 0         | 0         | 0         | 1           |

与 NS 组比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , NS 组——盐水组, PC 组——虎杖甙组, PP——脉压。

血时,组织切片见心、肾、肌肉的毛细血管内皮肿胀。Mazzoni 报告,家兔股薄肌毛细血管平均口径为  $5.3\mu\text{m}$ ,由于毛细血管管腔内皮菲薄,活体观察时,很难与周围组织区别。作者采用了充盈毛细血管内腔的红细胞宽度来间接判定毛细血管管腔的变化。正常红细胞在兔股薄肌毛细血管宽度为  $4.2 \pm 0.7\mu\text{m}$ 。失血性休克 30 分钟即可见毛细血管内皮肿胀,使通过管腔的红细胞变长和变细;休克后 1 小时,毛细血管中红细胞的宽度减少  $24.3 \pm 9.3\%$ ,长度增加  $22.8 \pm 6.4\%$  (图 1-3)。以正常毛细血管口径为  $5\mu\text{m}$  和内皮细胞厚度为  $0.5\mu\text{m}$  计算,毛细血管口径缩窄 25% 相当于内皮细胞有 1.25 倍的肿胀,带来液流阻力增加 2.16 倍。休克内皮细胞肿胀主要是由于细胞缺氧和缺少能量,使  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  泵功能障碍,细胞内水、钠增多所致;酸中毒致  $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  交换增加也参与其发生。内皮细胞肿胀使白细胞嵌塞是休克治疗后血压恢复而毛细血管仍然无复流和功能性毛细血管密度 (functional capillary density, FCD) 减少的重要原因。高渗制剂 (如 7.5% NaCl-6% 右旋糖酐) 有减轻内皮细胞水肿和恢复毛细血管血流的作用。

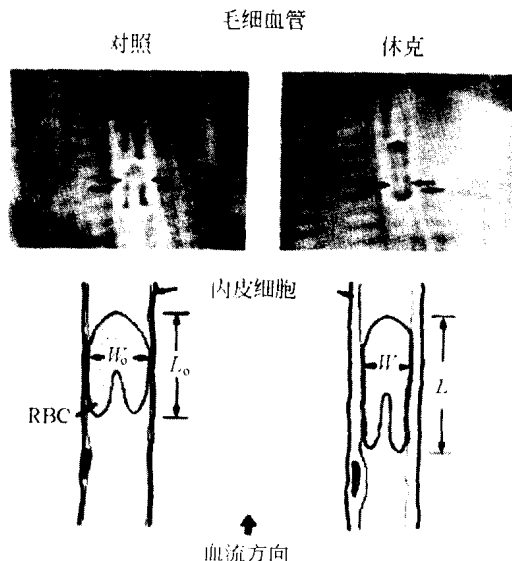


图 1-3 失血性休克时毛细血管管腔变化 (引自 Mazzoni MC, 1989)

失血性休克后毛细血管的外径并无变化,内皮肿胀使内径变小,红细胞变窄和变长。

$W_0$ : 红细胞宽度,  $L$ : 红细胞长度。

#### 4. 白细胞-内皮细胞间黏着力增加

白细胞与内皮细胞之间黏着应力 (adherence stress,  $\delta$ ) 是阻碍白细胞通过毛细血管的重要因素, 其中黏附蛋白起重要作用。一般认为, 白细胞扣押于毛细血管的初始过程黏附蛋白不起重要作用, 但它在后续的维持白细胞嵌塞和白细胞游出过程中起重要作用, 其中包括选择蛋白 (如 L-selectin), 整合蛋白 (如 CD11/CD18) 及 ICAM-1 等。应用黏附蛋白单抗可以使 fMLP 和补体刺激扣押在肺毛细血管的白细胞得到释放, 也可以减轻和防止休克时毛细血管无复流现象, 提示存在 CD18 依赖的毛细血管扣押现象。早些年由于毛细血管内皮细胞黏附蛋白表达在黏着应力增加中的作用难以测定, 因此, 黏附在白细胞-毛细血管内皮细胞中作用不像在微静脉那样确定。

近年研究证明, 白细胞和内皮细胞黏着后, 触发了一系列信号事件。白细胞变得扁平, 微管重新组装, 在伪足部充填了肌动蛋白, 用微吸管技术证明伪足比细胞体有更高的硬度。黏附以后也激发了血管内皮细胞之间信号传递, 如白细胞 CD11/CD18 黏附蛋白与内皮细胞相应配基 (ICAM-1) 结合后, 引起内皮细胞的细胞骨架重建 (remodeling), 增加了内皮细胞的黏度。内皮的细胞骨架重组需要 ICAM-1 信号, 黄嘌呤氧化产生的活性氧, p38 激酶的磷酸化, 以及 F-肌动蛋白的聚合, 但不需要 NO 和 MLCK 介导的肌球蛋白收缩。上述变化可能为扣押的白细胞游出作准备, 但其意义还有待进一步阐明。

### 三、休克时白细胞在微静脉附壁黏着

#### (一) 白细胞在微静脉黏附现象

在正常微静脉中, 白细胞位于轴流, 由于流速较快, 且混杂于数量比之多几百倍的红细胞之中, 因此, 在显微镜下看不清流动的白细胞。休克时白细胞由轴流向边流移动, 流速减慢使显微镜下可以分辨, 出现附壁滚动, 继而贴壁黏着, 直至跨壁游出管外。据我们研究, 正常大鼠脊斜肌三级微静脉中, 可见少数白细胞附壁滚动, 但很少贴壁黏着, 附壁黏着的白细胞在 94 $\mu\text{m}$  长的微静脉壁上平均不足一个 ( $0.6 \pm 0.3$  个/94 $\mu\text{m}$ )。在失血性休克初期, 附壁滚动的白细胞明显增多, 2~8 分钟达高峰, 以后又逐渐下降; 而黏着的白细胞从 3 分钟起逐渐增多, 到休克 30 分钟可达失血前 18~20 倍 (图 1-4)。

近年的研究查明, 白细胞在微静脉中附壁滚动可以走一段距离, 其中只有部分发生黏着。在小鼠提睾肌用 TNF- $\alpha$  刺激后, 观察到白细胞在微静脉中滚动距离达 270 $\mu\text{m}$ , 滚动时间为 86 秒, 滚动的速度每秒钟减慢 0.3 $\mu\text{m}$ , 而最终运动停止的白细胞为 74%。在缺血-再灌注条件下, 用结合选择蛋白的碳水化合物岩藻多糖 (fucoidin)、P-选择蛋白抗体、L-选择蛋白抗体使滚动白细胞减少 60%, 它并不影响白细胞附壁黏着数, 只有用高剂量岩藻多糖, 使滚动白细胞减少 90% 以上, 才能明显减少白细胞贴壁黏着。用基因打靶技术, 去除选择蛋白, 如 L/E-/- (保留 P 选择蛋白) 或 L/P-/- (保留 E 选择蛋白) 的小鼠在 TNF $\alpha$  刺激后, 附壁滚动白细胞减少和速度减慢; 但刺激后 2 小时和 6 小时, 贴壁黏着的白细胞数并无明显减少。上述结果证明, 在感染、炎症、缺血-再灌注条件下, 只有少量滚动的白细胞会贴壁黏着。

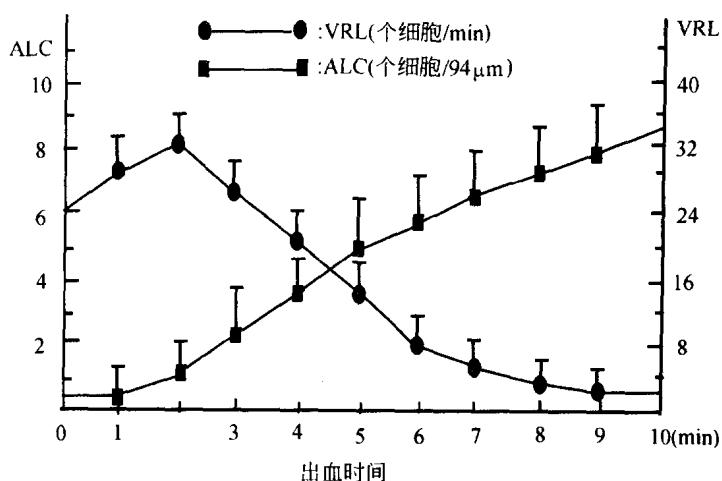


图 1-4 失血性休克大鼠微静脉中白细胞变化曲线

可见在失血后两分钟滚动白细胞数达高峰，而黏着白细胞在 3 分钟后逐渐增多。

VRL：可见滚动白细胞，ALC：黏着白细胞计数。

休克时白细胞在微静脉中附壁黏着见于骨骼肌、心、脑、肠系膜等多个器官。与白细胞扣押于肺毛细血管不同，白细胞扣押主要是由于白细胞变形力下降等机械因素所致；而白细胞在微静脉中附壁黏着主要是通过经典的黏附蛋白途径导致其发生。白细胞的黏附过程包括 4 种相互作用：起始接触、附壁滚动、贴壁黏着、跨壁游出。通常可把它们归纳成两类结合反应，即接触/滚动和黏着/游出反应。由选择蛋白-碳水化合物介导的白细胞黏附参与了早期接触和滚动的发生，由整合蛋白-多肽介导的黏附作用参与了白细胞黏着和游出的发生。

## (二) 选择蛋白家族和白细胞附壁滚动

选择蛋白家族是一类蛋白质，它可选择性介导细胞的相互作用 (selective cellular interaction)，从而命名为选择蛋白 (selectin)。而这种选择作用是通过选择蛋白分子中的凝集素 (lectin) 片段与靶细胞上的碳水化合物结构相互作用来完成的。

选择蛋白家族主要包括 L-选择蛋白，E-选择蛋白，P-选择蛋白 3 种，选择蛋白前方大写的 L、E、P 分别代表最初发现表达的细胞 (淋巴细胞，内皮细胞，血小板) 的名称。目前知道表达这些黏附蛋白的细胞远不止上述 3 种 (见表 1-4)。

表 1-4 选择蛋白家族和其表达的细胞

| 选择蛋白   | CD 命名 | 同义词      | 表达细胞    |
|--------|-------|----------|---------|
| L-选择蛋白 | CD62L | Mel 14   | 中性粒细胞   |
|        |       | LAM-1    | 淋巴细胞    |
|        |       | LECCAM-1 | 单核细胞    |
| E-选择蛋白 | CD62E | LHR      | 激活的内皮细胞 |
|        |       | ELAM-1   |         |
| P-选择蛋白 | CD62P | LECCAM-2 | 激活的血小板  |
|        |       | PADGEM   | 激活的内皮细胞 |
|        |       | GMP-140  |         |
|        |       | LECCAM-3 |         |

3种选择蛋白在人类基因定位于1号染色体长臂的q21~24带。3种选择蛋白的基因组成有类似的结构：①胞外区，从氨基端开始为凝集素结构域(lectin domain)、表皮生长因子结构域(EGF domain)、补体调节蛋白重复序列域(CR)；②跨膜区，包括几个疏水氨基酸残基；③胞内区，为羧基端短的尾部(图1-5)。凝集素由120个氨基酸残基组成，它可以结合碳水化合物，是选择蛋白分子结合配基的部位。

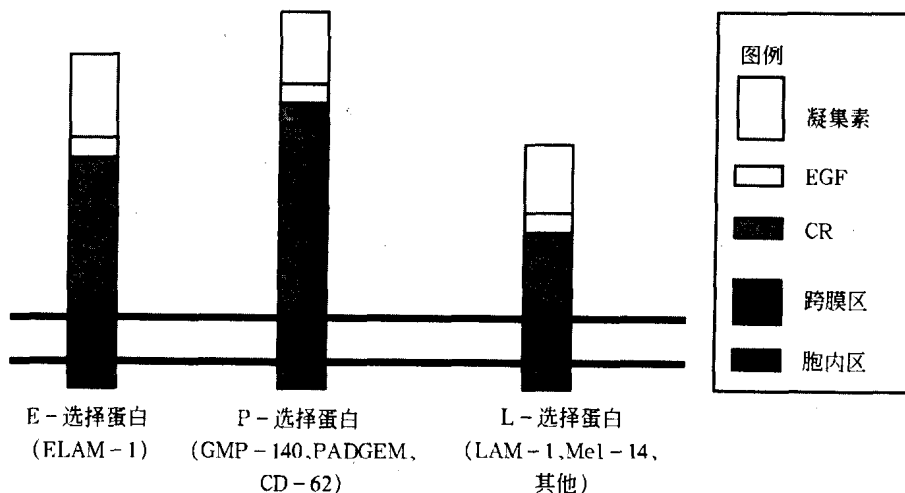


图1-5 选择蛋白的分子结构 (引自 Forrest M, 1995)

L-选择蛋白表达于静息的白细胞膜表面微绒毛的尖端，它作为黏附分子的功能是介导循环中的白细胞与血管内皮细胞表面特殊结构相互结合。这种结合主要是通过L-选择蛋白中的凝集素与靶细胞上的寡糖基团结合，给外源性寡糖可以阻断这种结合。已查明淋巴细胞与淋巴结周围“高内皮微静脉”(high endothelial venule, HEVs)的内皮细胞的黏附依赖于L-选择蛋白，它可以被高浓度的单糖(6-磷酸甘露糖, 1-磷酸岩藻糖)和低浓度的多糖(fucoidin, PPME)所抑制。细胞因子(G-CSF、GM-CSF、TNF $\alpha$ )激活中性粒细胞可一过性增加它与PPME的结合能力，并在15分钟内恢复正常。此时并不伴有L-选择蛋白表达的增多，估计是白细胞激活引起L-选择蛋白分子构型的变化，带来黏附力的增强。白细胞激活以后，表面的L-选择蛋白可能发生下调，主要是由于蛋白裂解使L-选择蛋白脱落，使正常人和败血症病人血浆中均测到可溶性L-选择蛋白。这种脱落现象发生十分迅速，在fMLP(趋化寡肽)作用5分钟内可使50%的L-选择蛋白脱落。本室查明重症烧伤后白细胞中L-选择蛋白mRNA转录也是下调的，参与L-选择蛋白下调的发生。选择蛋白的脱落可能是一种预防性负反馈抑制，使重新循环的白细胞不再发生与内皮细胞的黏着现象，此外，脱落的L-选择蛋白可能对后续的整合蛋白(integrin)和ICAM-1作用是必需的。

E-选择蛋白并不表达于正常的微血管内皮，而是在创伤、炎症条件下，内皮细胞受刺激后表达的新的黏附分子。它需要新的RNA和蛋白合成，并受转录因子NF- $\kappa$ B调控，主要见于微静脉血管内皮。细胞因子IL-1、TNF $\alpha$ 和LPS等促进内皮细胞表达，而IL-4和TGF $\beta$ 抑制上述因子诱导的E-选择蛋白合成。一般在刺激后4小时表达达到高峰，