

## · 论著 ·

## 脂多糖致肺血管内巨噬细胞释放炎症因子变化的研究

李胜亮 张淑琴 秦翠平 陈彬 陈正堂 金敬顺 伍伟玲

**【摘要】** 目的 探讨肺血管内巨噬细胞(PIM)在感染性急性肺损伤(ALI)发病中的作用。方法 按照 Morton 法分离、培养猪 PIM,予 10 mg/L 脂多糖(LPS)刺激,酶联免疫吸附法(ELISA)测定肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6(IL-6)和 IL-8 的含量。结果 LPS 刺激后,PIM 释放 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-8 增多,峰值分别出现在刺激后的 1、4 和 6 h,与刺激前相比,差异均有显著性( $P$  均 $<0.01$ )。结论 LPS 刺激后,PIM 分泌多种细胞因子,其中 TNF- $\alpha$  升高最早,提示其在 ALI 发病早期起重要作用;而 IL-6、IL-8 升高较晚,且后者持续时间较长,可能对 ALI 的病情进展起重要作用。细胞因子间的相互作用在 ALI 发病中似乎更为重要。

**【关键词】** 肺血管内巨噬细胞; 细胞因子; 肺损伤,急性

Changes in inflammatory cytokines released by pulmonary intravascular macrophages after stimulation with lipopolysaccharide LI Sheng-liang\*, ZHANG Shu-qin, QIN Cui-ping, CHEN Bin, CHEN Zheng-tang, JIN Jing-shun, WU Wei-ling. \*The 517th Hospital of PLA, Kelan 036301, Shanxi, China

**【Abstract】** Objective To investigate the roles of pulmonary intravascular macrophages (PIMs) in the pathogenesis of infective acute lung injury (ALI). Methods Porcine pulmonary blood vessels were flushed by modified Morton's method, PIMs were isolated with adhesion method and incubated in RPMI 1640 medium. They were stimulated with lipopolysaccharide (LPS, 10 mg/L). The contents of interleukin-6 (IL-6), IL-8 and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in the culture supernatants were respectively measured by enzyme linked immunoadsorbent assay (ELISA). Results The release of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-8 by PIMs was increased significantly as compared with the levels before stimulation by LPS, peaking at 1, 4, and 6 hours after LPS stimulation, respectively. The differences were significant (all  $P < 0.01$ ). Conclusion Among the cytokines released by PIMs after LPS challenge, the increase in TNF- $\alpha$  content occurs earlier in comparison with that of IL-6 and IL-8, suggesting that the former may play an important role at the early stage of ALI. On the other hand, the increase in IL-6 and IL-8 contents is later than that of TNF- $\alpha$  and lasts for a longer time, suggesting that they may be associated with the development of ALI. The results also suggest that interaction of these cytokines is more important in the pathogenesis of ALI.

**【Key words】** pulmonary intravascular macrophage; cytokine; acute lung injury

急性呼吸窘迫综合征(ARDS)是多种原因引起的严重急性肺损伤(ALI),其发病机制多被认为是机体在致病因子作用下发生的过度炎症反应,导致肺血管内皮和肺泡上皮广泛破坏的结果。这种过度的炎症反应涉及多种细胞及其介质,其中单核/巨噬细胞及其释放的众多细胞因子,以及炎症细胞和介质形成的级联反应在目前更受重视。肺血管内巨噬细胞(pulmonary intravascular macrophage, PIM)是肺巨噬细胞的亚群之一,其吞噬、分泌功能非常活

跃,且由于它所处的特殊部位,在 ALI 中的作用尤为引人注目<sup>[1]</sup>。本实验拟在成功分离、培养猪 PIM 的基础上,观察脂多糖(LPS)刺激前后 PIM 培养液上清中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6(IL-6)以及 IL-8 的含量变化,旨在探讨这些炎症细胞因子在 ALI 中的作用。

## 1 材料与方 法

1.1 PIM 分离、培养及鉴定:按改良的 Morton 法分离和培养猪 PIM<sup>[2]</sup>,用贴壁法获得黏附的 PIM。苔盼蓝染色计数判断活力;瑞氏染色、非特异性脂酶染色及氟化钠抑制试验鉴定 PIM 并计算纯度。加 LPS(Sigma, 10 mg/L)于培养基中,取刺激前及刺激后 5 和 30 min 以及 1、2、4、6 和 8 h 的培养液上清,测定 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-8 的含量。

1.2 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-8 含量的测定:采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-8

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39800064)

作者单位:036301 山西岢岚,解放军第五一七医院内科(李胜亮,张淑琴,秦翠平,陈彬);400037 重庆,第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所(陈正堂,金敬顺,伍伟玲)

作者简介:李胜亮(1962-),男(汉族),山西大同人,主任医师,全军呼吸内科专业委员会委员,总装备部内科专业委员会副主任委员,主要研究方向为急性呼吸窘迫综合征,获全军科技进步二等奖 1 项、四等奖 2 项,已发表论文 50 余篇,参加专著编写 1 部。

表 1 LPS 刺激前后 PIM 释放 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-8 的变化( $\bar{x}\pm s$ )Table 1 Changes of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-8 released by PIMs after stimulation with LPS( $\bar{x}\pm s$ )  $\mu\text{g/L}$ 

细胞因子	刺激前	刺激后 5 min	刺激后 30 min	刺激后 1 h	刺激后 2 h	刺激后 4 h	刺激后 6 h	刺激后 8 h
TNF- $\alpha$	0.68 $\pm$ 0.08	0.72 $\pm$ 0.12	0.89 $\pm$ 0.12	3.32 $\pm$ 0.15 $\Delta$	0.94 $\pm$ 0.15	0.85 $\pm$ 0.12	0.82 $\pm$ 0.11	0.72 $\pm$ 0.05
IL-6	0.27 $\pm$ 0.12	0.33 $\pm$ 0.11	0.35 $\pm$ 0.11	0.41 $\pm$ 0.13	0.63 $\pm$ 0.15	0.80 $\pm$ 0.36 $\Delta$	0.59 $\pm$ 0.23	0.51 $\pm$ 0.16
IL-8	1.84 $\pm$ 0.53	1.99 $\pm$ 0.51	2.51 $\pm$ 0.76	2.86 $\pm$ 0.77	2.92 $\pm$ 0.46	3.79 $\pm$ 0.75*	4.94 $\pm$ 1.19 $\Delta$	4.20 $\pm$ 0.80 $\Delta$

注:与本组刺激前比较:\* $P<0.05$ , $\Delta P<0.01$

含量,试剂盒均购自第四军医大学免疫学教研室。

1.3 统计学分析:实验数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,用单因素方差分析程序处理, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

LPS 刺激前后 PIM 释放 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-8 的变化见表 1。LPS 刺激后 TNF- $\alpha$  含量逐渐升高,1 h 达峰值( $P<0.01$ );LPS 刺激后 4 h IL-6 含量升至刺激前的 3 倍( $P<0.01$ );刺激后 4~8 h IL-8 持续升高,6 h 达峰值( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。

## 3 讨论

3.1 TNF- $\alpha$  在 ALI 中的作用:目前认为 TNF- $\alpha$  是介导 ALI 的主要细胞因子,给动物注射 TNF- $\alpha$  可诱发 ALI,其病理改变酷似 ARDS<sup>[3]</sup>。本实验结果显示,LPS 刺激后 1 h PIM 分泌 TNF- $\alpha$  即显著升高,表明 TNF- $\alpha$  是 ALI 时最早诱生的细胞因子,在 ALI 发病早期起重要作用,故称之为前炎症细胞因子(proinflammatory cytokines)。TNF- $\alpha$  可作用于多形核白细胞(PMN),使之脱颗粒,产生氧自由基及蛋白水解酶等炎症介质;还可上调内皮细胞白细胞黏附分子-1 及细胞间黏附分子-1<sup>[4]</sup>,从而促进 PMN 与内皮细胞黏附,进而向肺内浸润,释放炎症介质,导致肺损伤。

3.2 IL-6 在 ALI 中的作用:研究表明,IL-6 对机体的作用有双重性:一方面,IL-6 促进 PMN 氧化爆发和脱颗粒,亦可刺激肝细胞产生急性期蛋白,从而在 ALI 等急性炎症反应中起重要作用<sup>[5]</sup>;另一方面,IL-6 有抗炎效应<sup>[6]</sup>,如诱导皮质类固醇的合成,抑制 T 细胞活化,在体内外尚能抑制 IL- $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的合成,预先用 IL-6 抗体能增加实验动物的死亡率<sup>[7]</sup>。IL-6 的抗炎作用对于 ALI 过度炎症反应的控制无疑是十分重要的。但 ALI 时 IL-6 在体内究竟是以抗炎作用为主还是以促炎作用为主,尚不清楚。IL-6 具有“双刃剑”作用,如何扬长避短,发挥 IL-6 的有利作用,设法抑制其不利的作用,亦有待深入研究。

3.3 IL-8 在 ALI 中的作用:IL-8 在 PIM 受 LPS 刺激后 4~8 h 持续升高,虽较 TNF- $\alpha$  晚,但持续

时间长。IL-8 虽亦为 PMN 趋化剂和活化剂,但不似 C5a 等能被血清灭活,却可在肺局部积聚,对 PMN 发挥持续趋化和激活效应,且作用强于 C5a。IL-8 还可增加 L-选择素白细胞黏附分子-1 时表达,促进整合素介导的 PMN 与内皮细胞黏附及 PMN 跨内皮向肺内浸润,导致 ALI<sup>[7]</sup>。故 IL-8 可能在 ALI 病情进展及预后转归上起更重要的作用。

3.4 3 种细胞因子间相互作用及其在 ALI 发病中的意义:本实验结果表明,PIM 受 LPS 刺激后分泌的 3 种细胞因子升高时间有先后,最早是 TNF- $\alpha$ ,其次是 IL-6,最晚是 IL-8。这种先后顺序,一方面可能取决于 PIM 释放细胞因子的特性;另一方面可能与细胞因子间的相互作用有关。有资料表明,TNF- $\alpha$  可刺激 IL-6 和 IL-8 的释放<sup>[8]</sup>,TNF- $\alpha$  的致炎作用在一定程度上是由 IL-8 介导的<sup>[9]</sup>。进一步分析上述细胞因子之间的关系时还发现,当由 IL-6 升高达峰值时,TNF- $\alpha$  却从峰值急剧下降,提示 IL-6 对 TNF- $\alpha$  的释放有抑制作用<sup>[10]</sup>。这是否与前述的 IL-6 抗炎作用有关,值得进一步探讨。

细胞因子间极为复杂的相互作用,形成细胞因子网络,相互诱生,相互制约,一旦平衡被打破,可发生细胞因子失控性释放,形成全身炎症反应综合征(SIRS),在肺部则为 ARDS 或 ALI。

由于革兰阴性( $G^-$ )菌是 ARDS 首要原发疾患或诱发因素,加之 PIM 在肺血管内的特殊部位,提示在  $G^-$  菌脓毒症时,LPS 首先激活 PIM,使之释放 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-8 等细胞因子,通过这些细胞因子直接和相互作用,在 ALI 或 ARDS 发病中可能有重要始动作用。

## 参考文献:

- 李胜亮,陈正堂,毛宝龄.肺血管内巨噬细胞与急性肺损伤[J].国外医学呼吸系统分册,1996,16:197-199.
- 李胜亮,陈正堂,金敬顺.肺血管内巨噬细胞的分离、培养及鉴定[J].中华病理学杂志,1998,27:66-67.
- 张青,徐剑斌,毛宝龄,等.内毒素致伤大鼠肺组织 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的 mRNA 表达及 TNF-IL6 活化研究[J].中国危重病急救医学,2001,13:523-526.
- 孙中吉,卢青,李银平.急性呼吸窘迫综合征发病中的细胞因子和炎症介质[J].中国危重病急救医学,2003,15:186-189.
- 邱海波,周韶霞,陈德昌.白介素-10 对肺泡巨噬细胞致炎效应的

- 调节作用[J]. 中国危重病急救医学, 2000, 12: 353-355.
- 6 Barton B E, Shortall J, Jackson J V. Interleukin - 6 and 11 protect mice from mortality in a staphylococcal enterotoxin - induced toxic shock model[J]. Infect Immun, 1996, 64: 714-718.
- 7 Barton B E, Jackson J V. The protective role of IL - 6 in a septic shock model[J]. Infect Immun, 1993, 61: 1496-1499.
- 8 黎擅实, 尹明, 吴旭辉, 等. 生长激素对酸吸入性肺损伤大鼠肺组织细胞凋亡的作用[J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14: 728-731.
- 9 李胜亮, 陈正堂. IL - 8 与急性呼吸窘迫综合征[J]. 国外医学呼吸系统分册, 1997, 17: 85-93.
- 10 Conroy D M, Francischi J N, Sirois P. Effect of tumor necrosis factor receptor binding protein on cell infiltration induced by lipopolysaccharide and sephadex beads in guinea pig lung[J]. Inflammation, 1995, 19: 233-243.

(收稿日期: 2005-11-24 修回日期: 2006-01-10)

(本文编辑: 李银平)

## • 经验交流 •

### 24 例尿毒症肺的临床分析

胡光 王朝晖 卓华钦

【关键词】 尿毒症; 肺水肿; 血液透析

尿毒症患者可出现肺部损害。由尿毒症所致的肺部损害也称尿毒症肺, 可直接影响患者的生存, 已越来越受到重视。分析我院收治的 24 例尿毒症肺患者临床资料, 报告如下。

#### 1 临床资料

1.1 病例: 2000 年 3 月—2003 年 6 月我院收治尿毒症患者 40 例, 既往均无慢性肺部疾病及长期吸烟史, 分为两组。尿毒症肺组 24 例, 均符合 1977 年全国(北戴河)肾病座谈会制定的尿毒症肺诊断标准: 血肌酐(SCr) > 442 μmol/L, 血尿素氮(BUN) > 22.1 mmol/L, 有明显的呼吸道症状和胸部 X 线改变, 能排除继发性感染和其他肺部疾病; 男 14 例, 女 10 例; 年龄 49~74 岁, 平均(63.5 ± 6.9) 岁; 出现尿毒症病史 6~54 个月, 平均(24.8 ± 15.4) 个月。非尿毒症肺组 16 例, 男 9 例, 女 7 例; 年龄 42~73 岁, 平均(60.8 ± 8.8) 岁; 出现尿毒症病史 12~56 个月, 平均(26.6 ± 12.2) 个月。两组患者一般资料比较差异无显著性(P 均 > 0.05), 具有可比性。

1.2 治疗方法: 两组均联合应用硝苯地平、哌唑嗪等降压药物控制血压。应用 Fresenius 4008 S 透析机(内置联机清除

率监测器, OCM) 和常规碳酸氢盐透析, 聚砜膜透析器, 血流速度 250 ml/min, 透析液流速 500 ml/min, 应用动-静脉内瘘, 普通肝素抗凝, 脱水量为 2~5 kg, 每周行血液透析(血透) 2~3 次, 每次 4~5 h。观察血透前和血透 2 周后两组患者的临床症状、体征和胸部 X 线表现, 体重、血中血红蛋白(Hb)、血浆白蛋白(ALB)、BUN、SCr、二氧化碳结合力(CO<sub>2</sub>CP) 等变化。通过 OCM 测定尿素清除率 ≥ 1.2 ml/s 为透析充分标准。

1.3 统计学方法: 计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, t 检验, 计数资料应用  $\chi^2$  检验, P < 0.05 为差异有统计学意义。

#### 2 结果

2.1 血透 2 周后尿毒症肺患者症状或体征消失 17 例(占 70.8%), 好转 7 例(占 29.2%)。10 例复查 X 线胸片, 表现基本正常 7 例, 好转 3 例。

2.2 表 1 结果显示, 尿毒症肺组 ALB、Hb、CO<sub>2</sub>CP 均较非尿毒症肺组显著降低(P 均 < 0.05), 而 BUN、SCr 均较非尿毒症肺组升高(P 均 < 0.05)。透析间期体重增长过多和透析不充分与尿毒症肺的发生有关。

#### 3 讨论

尿毒症肺的可能发病机制: ① 血液中 BUN、SCr 增高或某些分子肌类物质导致肺毛细血管通透性增高; ② 水、钠潴留使毛细血管静水压增高; ③ 低蛋白血症使血浆胶体渗透压下降; ④ 慢性肾小球肾炎所致尿毒症使非毛细血管基底膜发生免疫性损伤, 造成其通透性改变, 大量液体外渗至肺泡和肺间质, 引起肺损伤; ⑤ 贫血可使一氧化氮传递能力下降, 肺功能受损; ⑥ 细胞因子可能在发病机制中起重要作用; ⑦ 水、钠潴留, 贫血, 酸中毒和高血压等可增加心脏负荷, 导致左心衰竭, 加重肺部病变。

尿毒症肺的临床表现不一, 需要结合肾功能和胸部 X 线等辅助检查来综合判断。其 X 线胸片的表现不特异, 临床上需与心源性肺水肿和肺部感染等疾病相鉴别。部分尿毒症患者的临床表现与胸部 X 线改变不平行, 易造成漏诊或误诊。建议凡是慢性肾功能衰竭患者, BUN 中等程度增高, 具有呼吸系统临床表现和胸部 X 线出现上述异常改变, 排除其他肺部疾病和器质性心脏病, 即可诊断为尿毒症肺。

表 1 尿毒症肺组和非尿毒症肺组相关指标比较

组别	例数 (例)	Hb ( $\bar{x} \pm s, g/L$ )	ALB ( $\bar{x} \pm s, g/L$ )	BUN ( $\bar{x} \pm s, mmol/L$ )	SCr ( $\bar{x} \pm s, \mu mol/L$ )	CO <sub>2</sub> CP ( $\bar{x} \pm s, mmol/L$ )	透析间期体重增长量(例)		尿素清除率(例)	
							< 3 kg	≥ 3 kg	< 1.2 ml/s	≥ 1.2 ml/s
非尿毒症肺组	16	89.8 ± 11.0	36.4 ± 4.9	25.9 ± 5.9	901.3 ± 112.5	19.7 ± 2.1	12	4	5	11
尿毒症肺组	24	82.5 ± 10.2	32.8 ± 4.4	30.8 ± 6.1	1 081.1 ± 151.3	17.7 ± 2.5	9	15	16	8
检验值		t = 2.35	t = 2.40	t = 2.58	t = 2.47	t = 2.36	$\chi^2 = 2.40$		$\chi^2 = 2.36$	
P 值		< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05		< 0.05	

作者单位: 523320 广东省东莞石龙人民医院

(收稿日期: 2005-12-08)

作者简介: 胡光(1958-), 男(汉族), 内蒙古包头人, 副主任医师。

(本文编辑: 郭方)