文章编号:1000-5404(2005)03-0217-03

论著

3 种不同致伤条件下在体肺泡巨噬细胞的 CD68 和 TNF-α 表达

温建良,谢志坚,吕凤林,李　磊　(第三军医大学大坪医院野战外科研究所创伤感染研究室,重庆 400042)

提　要:目的　探讨不同致伤条件对继发性肺损伤肺泡巨噬细胞 CD68 和 TNF-α 表达的影响。**方法**　利用免疫组化方法,将两种抗体进行双标染色,观察大鼠在创伤、LPS 腹腔感染、创伤复合 LPS 腹腔感染时与正常情况下肺泡巨噬细胞阳性表达情况,结合各组死亡率和常规 HE 染色进行分析。**结果**　肺泡巨噬细胞 CD68 和 TNF-α 阳性表达细胞在伤后均明显增加,与对照组差异显著($P<0.01$),各致伤组间也有差异($P<0.01$),创伤复合 LPS 腹腔感染组增加最显著,LPS 腹腔感染组次之,创伤组最少。**结论**　肺泡巨噬细胞 CD68 和 TNF-α 的表达受致伤因素的影响,其表达强度随伤情加重而增强。

关键词:肺泡巨噬细胞;CD68;TNF-α
中图法分类号:R322.35;R392.12　　**文献标识码**:A

Expressions of CD68 and TNF-α on alveolar macrophages in post-injured rats

WEN Jian-liang, XIE Zhi-jian, LU Feng-lin, LI Lei (Department of Trauma Infection, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective　To study the expressions of CD68 and TNF-α on alveolar macrophages (AMs) in rats injured by different wound factors. **Methods**　CD68 and TNF-α were detected by double-labelling immunohistochemical method in four groups (normal, trauma, LPS, trauma and LPS). **Results**　CD68 and TNF-α positive cells increased significantly in three injured groups ($P<0.01$). There was significant difference in CD68 and TNF-α positive cells as compared with the control group ($P<0.01$). The most significant increase was observed in the groups of trauma and LPS, followed by LPS group. The lowest level of CD68 and TNF-α positive cells was found in the trauma group. **Conclusion**　The expression of CD68 and TNF-α on AMs can be affected by different wound factors. The intensity of expression may be enhanced in a severity-dependent manner.

Key words: alveolar macrophage; CD68; TNF-α

创伤性急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是创伤后常见的继发损伤,常发展为急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS),并可导致 MODS 发生[1]。有研究表明,ALI 的发生与 TNF-α、IL-1、IL-8 等炎性因子有关[2]。这些炎性因子的主要来源是创伤后活化的巨噬细胞。CD68 为巨噬细胞特异抗原,是确定巨噬细胞的直接证据。本研究通过对 3 种不同致伤条件下在体肺泡巨噬细胞(alveolar macrophage, AM)的 CD68 和 TNF-α 表达观察,探讨肺炎症反应中肺泡巨噬细胞的作用,为临床预防创伤后肺损伤提供实验依据。

1　材料和方法

1.1　动物分组及创伤模型的制作

健康 Wistar 大鼠 56 只(第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供),体质量(250±50)g,雄性,随机分为 4 组:正常对照组(8 只)、单纯创伤组(16 只)、LPS 诱导组(16 只)、创伤复合 LPS 诱导组(16 只)。单纯创伤组采用大鼠乙醚麻醉状态下双后肢闭合性砸伤并股骨骨折模型:即以 200 g 砝码于 20 cm 高处自由垂直落下砸于大鼠后肢上,反复砸击 10 次,然后再将股骨致闭合性骨折。LPS 诱导组采用腹腔注射 LPS (2 mg/kg)。创伤复合 LPS 诱导组创伤方法同前,致伤后腹腔注射 LPS (2 mg/kg)。伤后即刻成活率 100%,伤后 24 h 活杀取肺组织。死亡大鼠不取材,只记录死亡率。

1.2　主要试剂和仪器

脂多糖(LPS,0111:B4,Sigma 公司,USA);兔抗大鼠 CD68 抗体(BA0461)、兔抗大鼠 TNF-α 抗体(BA0131)、组化双标染色试剂盒(SA2011)(武汉博士德公司)。倒置显微镜(IMT-2,OLYMPUS,JAPAN);石蜡(组织)切片机(LEICA,GERMANY)。

作者简介:温建良(1967-),男,四川省内江市人,主治医师,讲师,主要从事创伤感染与免疫方面的研究。电话:(023)68757810
通讯作者:李　磊,E-mail: leili@cta.cq.cn
收稿日期:2004-09-05;修回日期:2004-11-20

1.3 检测方法

肺组织经4%多聚甲醛固定48 h后行常规石蜡包埋、切片，切片厚度5 μm。分别行HE染色、免疫组化双抗体标记染色。免疫组化染色操作按说明书进行，用生物素化羊抗兔IgG作二抗；用抗CD68抗体作第1种一抗，反应后用BCIP/NBT显色，阳性反应呈紫蓝色，巨噬细胞的胞膜显色；抗TNF-α抗体作第2种一抗，反应后用AEC显色，阳性反应呈棕色，巨噬细胞的胞质显色。阴性对照用TBS代替一抗。

1.4 观察指标

伤后24 h内大鼠一般表现：精神、食欲、活动情况，死亡率。肺组织常规病理表现：有无出血、炎性渗出等。肺组织免疫组化表现：CD68、TNF-α的阳性表达细胞。

1.5 统计学处理

每张切片在放大400倍镜下取10个视野，记录阳性表达细胞数均值，作 t 检验。

2 结果

大鼠伤后一般表现：精神差、倦怠、少活动、食欲不振，有寒颤、呼吸加深。

伤后24 h内死亡率分别为：创伤组18.75%(3/16)，LPS组31.25%(5/16)，创伤复合LPS组37.5%(6/16)，无显著性差异。

肺组织切片HE染色：创伤组、LPS组、创伤复合LPS组均表现为肺泡壁增厚、出血、中性粒细胞、巨噬细胞及淋巴细胞浸润。

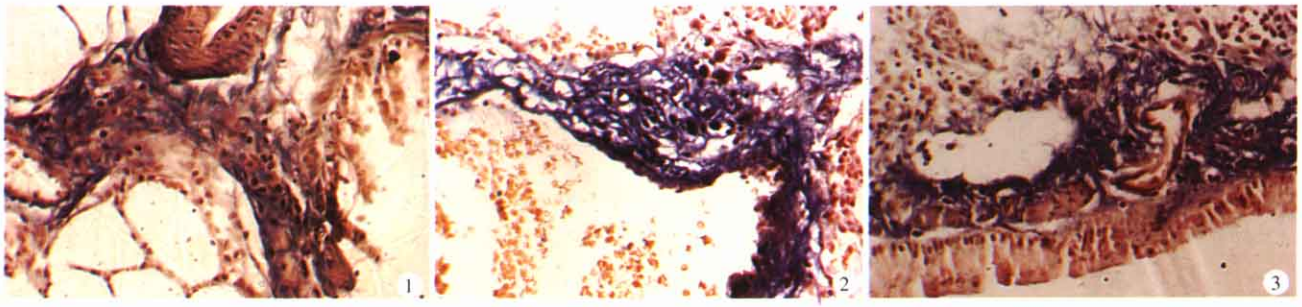
组织化学染色：正常对照组CD68阳性细胞少，细胞形态小，TNF-α表达低弱；各致伤组CD68阳性细胞多，细胞形态大，胞质TNF-α表达强，CD68阳性细胞主要在血管、小支气管周围，肺泡间散在出现，阳性细胞数量与对照组差别显著($P<0.01$)，各组间也差别显著($P<0.01$)。见表1及图1。

表1 肺组织中CD68阳性、TNF-α阳性细胞数($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Expression of CD68 and TNF-α in rat lung tissues ($\bar{x}\pm s$)

Group	Trauma($n=13$)	LPS($n=11$)	Trauma & LPS($n=10$)	Control($n=8$)
CD68 positive	5.6±0.4*#	8.2±0.7*	10.9±0.5*#	3.1±0.2
TNF-α positive	5.2±0.5	8.2±0.7	10.7±0.6	2.3±0.4

*: $P<0.01$, *vs* control; #: $P<0.01$, *vs* LPS



A: Trauma; B: LPS group; C: Trauma LPS; Blue-purple: CD68 (cell membrane); Brown: TNF-α(plasma)

图1 肺泡巨噬细胞CD68和TNF-α阳性表达 (SABC双染×400)

Fig 1 Expressions of CD68 and TNF-α on alveolar macrophages (SABC-doulbe staining ×400)

3 讨论

ALI的发病机制尚不十分明了，已知的危险因素和可能的发病机制包括两个方面：①肺细胞的直接损伤作用，如肺挫伤、误吸、溺水、毒物吸入、弥漫性肺部感染等；②急性全身炎症反应的间接结果，如脓毒血症、急性胰腺炎、肺部以外的严重损伤、休克等[1]。为了探讨创伤后继发性ALI中AM的作用，本组研究采用3种方式对肺外组织致伤，分别制成单纯创伤模型、感染模型、创伤复合感染模型，达到致肺损伤的目的。肺组织常规病理切片有炎症表现：出血、中性粒细胞、巨噬细胞及淋巴细胞浸润。同时观察到3组受试大鼠有全身中毒表现和较稳定的死亡率，其中创伤复合LPS组死亡率(37.5%)与临床创伤后脓毒症相似(30%～50%)[3]。利用免疫组化方法，将抗CD68抗体和抗TNF-α抗体在同一切片上进行双抗标记检测，原位反映CD68、TNF-α阳性表达，发现在伤后炎症反应中CD68、TNF-α阳性表达主要有两方面变化。①巨噬细胞的数量显著增加，TNF-α表达阳性细胞数与CD68阳性细胞数的增加相平行，以创伤复合LPS组最明显，其次为LPS组，单纯创伤组较低。②单个巨噬细胞的TNF-α表达明显增强。提示3种致伤状态下，AM浸润程度和炎性细胞因子的分泌存在差异，不同的致伤因素对肺泡巨噬细胞影响不同。

AM具有抗炎和炎性原双重作用。作为防御和修复肺损伤的一道重要防线，AM的增加是抗炎作用表现。ALI发病早期(6～24 h)，AM数量迅速增加，功能活跃。AM的增加是通过3条途径进行的：①局部增殖；②化学趋化和单核细胞分化；③死亡减少。AM的抗炎作用也可在ALI炎性反应的消退过程中观察到，

此时组织中单核细胞和巨噬细胞数量增加。AM 计数的增加也与 ALI 患者较高的生存率有关，提示它还可能在 ALI 的恢复中起有益作用[4]。本研究 3 组致伤大鼠 AM 数量增加的量因致伤方式不同而有所不同，反映出抗炎反应的强度不同。复合创伤组表现出最强的抗炎反应，却是死亡率最高的，提示机体受到的损伤最重。

研究表明，抗炎作用的同时，创伤后受激活的巨噬细胞是大量产生的炎性细胞因子如 TNF-α、IL-6 等的主要来源，巨噬细胞的功能异常是导致创伤后免疫功能紊乱的主要原因[5]。创伤后机体中性粒细胞、单核-巨噬细胞等免疫细胞及内皮细胞被激活而处于激发状态，前炎症介质如 IL-1、IL-6、IL-8、TNF-α 等大量释放，这些炎症因子介导了机体局部和全身的炎症反应，若继发感染，则使处于激发状态下的免疫细胞及内皮细胞出现超强反应，引起炎症介质的级联放大作用，诱发机体的 MODS，如处理不当则可导致患者死亡[6]。AM 功能的发挥在很大程度上是通过细胞因子对多形核白细胞(polymorphonuclear leukocytes, PMN)进行调控而实现的。当机体遭受打击时，AM 防御能力下降，不能及时清除凋亡的 PMN，后者产生继发性坏死，引起细胞内容物外泄，而 PMN 的细胞内容物不仅具有组织毒性，并且产生趋化片段以放大炎症效应，进而造成肺损伤。PMN 凋亡的延长可能与 AM 分泌 TNF-α 和 GM-CSF 有关[7]。因此，提示 AM 对不同的致伤因素的反应状态是导致本组实验中不同的死亡率的重要原因。ALI 的形成中，最为重要的早期反应细胞因子是 TNF-α、白介素-1β(IL-1β)和 IL-8。TNF-α 具有很强的炎性源作用，是早期 ALI 的重要介质[8]，TNF-α 的释放可诱导产生 IL-1β 和其他炎性原细胞因子，导致肺内中性粒细胞的扣押及脱颗粒。本实验中，TNF-α 表达因不同的致伤因素不同，以复合组和 LPS 组较强，单纯创伤组较弱，提示 TNF-α 表达的差异可能与 LPS 影响有关。LPS 是天然免疫系统的有效活化剂，主要经过单核细胞及 AM 介导，释放一系列炎症趋化因子及 TNF-α、IL-8、IL-1β、IL-6 等细胞因子，引起肺部炎症反应[9]。有实验证实 LPS 刺激常驻肺泡巨噬细胞产生 TNF-α、不产生抑制性因子 IL-10[10]。本实验中的 TNF-α 表达阳性细胞均有增加，但各组间差异显著，提示创伤及 LPS 两种致伤因素，均可诱导 AM 浸润、TNF-α 表达，且两种因素具相加效应，表明 TNF-α 表达增高可受多种因素影响，而其中 LPS 的影响较明显。因此，本组实验中 TNF-α 表达增高与 AM 的增加相平行，在不同的致伤因素下出现不同的表达强度。

综上所述，本组研究成功复制了临床创伤后继发性肺损伤的动物模型。观察到致伤后，肺组织肺泡巨噬细胞 CD68 和 TNF-α 的表达有明显增加和增强；不同的致伤因素下，肺组织肺泡巨噬细胞 CD68 和 TNF-α 的表达有明显差异，其表达强度与机体损伤严重程度一致，提示 AM 数量增多、TNF-α 分泌增加反映出 AM 在抗炎作用的同时又可能是加重创伤后继发肺损伤炎症反应的重要因素。

参考文献：

[1] 石应康. 急性肺损伤的研究进展[J]. 中华创伤杂志, 2000, 16(11): 645 - 647.

[2] Hasleton P S, Roberts T E. Adult respiratory distress syndrome-an update [J]. Histopathology, 1999, 34(4): 285 - 294.

[3] 盛志勇, 姚咏明. 脓毒症研究的现状与展望[J]. 解放军医学杂志, 1999, 24(2): 79 - 82.

[4] Steinberg K P, Milberg J A, Martin T R, *et al*. Evolution of bronchoalveolar cell populations in the adult respiratory distress syndrome[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1994, 150(1): 113 - 122.

[5] Yadavalli G K, Auletta J J, Gould M P, *et al*. Deactivation of the innate cellular immune response following endotoxic and surgical injury[J]. Exp Mol Pathol, 2001, 71(3): 209 - 221.

[6] 李　磊. 创伤后免疫功能的双向性改变及其研究新进展[J]. 国外医学免疫学分册, 1998, 21(3): 157 - 160.

[7] Herlihy J P, Vermeulen M V, Joseph P M, *et al*. Impaired alveolar macrophage function in smoke inhalation injury[J]. J Cell Physiol, 1995, 163(1): 1 - 8.

[8] Li X Y, Donaldson K, Brown D, *et al*. The role of tumor necrosis factor in increased airspace epithelial permeability in acute lung in flammation[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1995, 13(2): 185 - 195.

[9] Chen L Y, Zuraw B L, Zhao M, *et al*. Involvement of protein tyrosine kinase in Toll-like receptor 4-mediated NF-kappa B activation in human peripheral blood monocytes[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003, 284(4): L607 - 613.

[10] Salez L, Singer M, Balloy V, *et al*. Lack of IL-10 synthesis by murine alveolar macrophages upon lipopolysaccharide exposure. Comparison with peritoneal macrophages[J]. J Leukocyte Biol, 2000, 67(4): 545 - 552.

(编辑　龙　亮)