论著

文章编号:1000-5404(2005)17-1796-03

慢性阻塞性肺病患者肺泡巨噬细胞凋亡测定及其意义

曹国强[1],钱桂生[2],谢志坚[1] (第三军医大学:[1]大坪医院野战外科研究所呼吸内科,重庆 400042,[2]新桥医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,重庆 400037)

提 要:目的 探讨慢性阻塞性肺病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)患者肺泡巨噬细胞(alveolar macrophage, AM)凋亡特点。**方法** 经支气管肺泡灌洗获取肺泡巨噬细胞AM。①利用髓过氧化物酶(MPO)染色法观察AM的染色阳性率;②利用TUNEL技术观察支气管肺泡灌洗液中AM凋亡的变化和地塞米松对其凋亡的影响。**结果** ①COPD患者AM之MPO染色阳性率(0.8±0.3)%显著低于对照组(1.2±0.4)%($P<0.05$)。②支气管肺泡灌洗液中AM凋亡率(1.9±0.7)%显著低于对照组(4.8±1.3)% ($P<0.01$)。地塞米松处理12、24、48 h后的AM凋亡率分别为(9.2±2.3)%,(35.4±12.6)%和(45.8±9.2)%,显著高于对照组(5.9±1.8)%,(10.8±2.7)%和(24.1±4.6)%的凋亡率(P均<0.01)。**结论** 吸烟等多种因素可导致COPD患者AM凋亡减少,其对凋亡中性粒细胞(PMN)的吞噬能力下降;较大剂量的糖皮质激素能诱导AM凋亡。

关键词:细胞凋亡;肺疾病;慢性阻塞性;病理生理学;肺泡;巨噬细胞

中图法分类号:R322.35; R392.12; R563.902 **文献标识码**:A

Detection of alveolar macrophage apoptosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease

CAO Guo-qiang[1], QIAN Gui-sheng[2], XIE Zhi-jian[1] ([1]Department of Respiratory Diseases, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, [2]Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the apoptosis of alveolar macrophage and its significance in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Methods** A total of 11 patients with COPD and 10 healthy controls were enrolled in the study. Alveolar macrophages (AM) were harvested from the BALF (bronchoalveolar lavage fluid). The positive rate of myeloperoxidase (MPO) staining of alveolar macrophages by MPO staining was observed so as to indirectly reflect neutrophil apoptosis and the phagocytosis of apoptotic neutrophils by alveolar macrophages. Apoptosis were detected by the transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) technique. **Results** The positive rate of alveolar macrophages by MPO staining was lower in COPD group [(0.8±0.3)%] than the control group [(1.2±0.4)%] ($P<0.01$). The apoptotic rate of macrophages within BALF from COPD group was much lower than the control group [(1.9±0.7)% *vs* (4.8±1.3)%] ($P<0.01$). DEX induced the apoptosis of cultured alveolar macrophages in a time-dependent manner and the apoptotic rate of AM treated with DEX for 12, 24, 48 h in COPD group was higher than the control group. **Conclusion** There was a decreased apoptosis of alveolar macrophages and a less phagocytosis of apoptotic neutrophil by alveolar macrophages in patients with COPD. DEX can significantly induce the apoptosis of alveolar macrophages.

Key words: apoptosis; pulmonary disease; chronic obstructive/pathophysiology; lung alveolus; macrophage

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)患者肺的不同部位有肺泡巨噬细胞(alveolar macrophage, AM)增加[1]。主要来源于巨噬细胞的蛋白酶-基质金属蛋白酶几乎能降解所有的细胞外基质成分,近年来巨噬细胞及其蛋白酶在肺气肿形成中的作用研究已成为研究者关注的焦点。研究表明,COPD患者小气道病变的严重程度和肺气肿的严重程度与肺泡壁AM数目呈正相关[2,3],COPD的慢性进行性发展与受损肺组织中AM的慢性增多呈平行关系,本研究从细胞凋亡异常角度探讨AM在COPD发

作者简介:曹国强(1963-),男,河北省景县人,博士,副主任医师,副教授,主要从事慢性气道炎症发病机制方面的研究,发表论文25篇。电话:(023)68757939, E-mail:cgq1963@163.com.

收稿日期:2004-03-28;修回日期:2004-06-19

病中的作用。

1　资料与方法

1.1　临床资料

选择 2002 年 12 月至 2003 年 12 月在我院呼吸内科门诊接受纤维支气管镜检查患者 21 例。11 例患者经肺功能检查证实为 COPD 患者，支气管舒张试验阴性，诊断符合 COPD 诊治规范[1]，除外支气管扩张、肺结核等疾患，其中男 6 例，女 5 例，年龄 48～65 岁，平均(52 ± 9)岁；对照组 10 例，为因查体发现肺部阴影来行纤维支气管镜检查的患者，其中男 7 例，女 3 例，年龄 38～59 岁，平均(42 ± 7)岁，近 2 周内无呼吸系统感染病史，血常规检查未发现异常。

1.2　方法

1.2.1　支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid，BALF)收集及 AM 分离、纯化、体外培养　　按文献[4]方法进行。术前 12 h 禁食，术前 0.5 h 肌注阿托品 0.5 mg，雾化吸入 20 g/L 利多卡因 10 ml，鼻导管给氧 3 L/min，纤维支气管镜经鼻腔进入后予 20 g/L 利多卡因 5 ml 行常规局麻，将纤维支气管镜直接嵌入右中叶或左舌叶注入 20 g/L 利多卡因 2 ml 后，快速注入 37 ℃注射用生理盐水 50 ml × 3 次，并立即回抽液体至硅化的塑料容器内，回抽压力控制在(6.65～13.3) × 10^3，回收的 BALF 放入 4 ℃保温桶并立即送实验室处理。用两层无菌纱布过滤回收 BALF 后，于低温离心机离心 10 min，将细胞成分用加含胎牛血清(FCS)的 DMEM 液(青霉素 1 × 10^5 U/L，链霉素 0.5 × 10^5 U/L)，调整细胞浓度为 2 × 10^9/L，将上述细胞悬液接种至 4 孔(对照组只接种 1 孔)预先放有盖玻片的培养板中，置 37 ℃，50 ml/L CO_2 的培养箱中贴壁 2 h，吸出上清液，PBS 轻轻漂洗培养皿 3 次，去掉未贴壁细胞，将其中 1 孔细胞爬片取出，4% 的多聚甲醛固定 10 min，贮于 -20 ℃冰箱备用。11 例 COPD 患者各接种 3 孔并分别加入含有地塞米松(浓度为 2 mg/L)的 100 g/L FCS-DMEM 培养基，在培养 12、24 h 和 48 h 取出细胞爬片，PBS 轻轻漂洗后，4% 的多聚甲醛固定 10 min，贮于 -20 ℃冰箱备用。

1.2.2　AM 对凋亡中性粒细胞(polymorphonuclear neutrophils，PMN)的吞噬　　参照文献[5]的方法进行髓过氧化物酶(myeloperoxidase，MPO)染色。阳性反应呈蓝色或蓝棕色颗粒，定位于胞浆中。计数肺泡巨噬细胞 MPO 染色阳性细胞百分率。

1.2.3　TUNEL 技术检测 AM 凋亡　　细胞凋亡原位检测采用 TUNEL 技术，细胞凋亡原位检测试剂盒为德国 Boehringer Mannheim 公司产品。计算方法：选择 5 个以上具有代表性的高倍视野(×400)，计数 500 个 TUNEL 染色阳性的细胞数。凋亡指数 = 凋亡细胞数/细胞总数 × 100%

1.3　统计学分析

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 Origin5.0 软件进行双尾 t 检验。

2　结果

获得的 AM 经瑞氏-姬姆萨染色，纯度大于 95%。AM 胞浆染色成棕黄色者为凋亡阳性细胞(图 1)。COPD 患者 AM 凋亡率(1.9 ± 0.7)% 显著低于对照组(4.8 ± 1.3)%　($P < 0.01$)。地塞米松处理 12、24、48 h 后 AM 的凋亡率分别为(9.2 ± 2.3)%、(35.4 ± 12.6)% 和(45.8. ± 9.2)%，显著高于正常对照组的(5.9 ± 1.8)%、(10.8 ± 2.7)% 和(24.1 ± 4.6)% 的凋亡率($P < 0.01$)。COPD 患者肺泡巨噬细胞 MPO 阳性率(0.8 ± 0.3)% 显著低于对照组的(1.2 ± 0.4)%　($P < 0.05$)，即 COPD 患者 AM 对凋亡中性粒细胞的吞噬能力下降。



图 1　TUNEL 染色阳性的棕色颗粒位于肺泡巨噬细胞的细胞核(DAB × 200)

Fig 1　Brownish yellow granules of TUNEL positive staining in the AM nucleus (DAB × 200)

3　讨论

吸烟是 COPD 患者的主要诱因，吸烟者肺内 AM 数目增加的解释是[6]：①吸烟者粘膜纤毛清除功能下降。②组织损伤和(或)淋巴系统的破坏致淋巴清除功能降低。③淋巴系统不足以应付肺内细胞浸润的增多。研究还表明，巨噬细胞主要通过凋亡实现其生物学意义[7,8]。机体每天产生大约 1 × 10^{10} 个巨噬细胞，通过细胞凋亡机体以同样的速度清除衰老的巨噬细胞；此外，巨噬细胞在清除侵入机体的病原微生物时，易受到感染，如携带细菌、病毒、寄生虫等病原体，机体通过促进感染巨噬细胞的凋亡清除这些病原体。我们推测 COPD 患者肺内 AM 数目增加可能和其凋亡异常有关，实验结果也证实了上述推断的正确性。

AM 是一种多功能的间质细胞，除吞噬功能外其分泌功能越来越受到重视，AM 可分泌多种炎性介质，激发周围细胞共同参与调节 COPD 的免疫炎性反应，AM 源性的蛋白水解酶在肺气肿形成中的重要作用也成为研究者关注的焦点。AM 也可释放出更多的蛋白酶和趋化因子，募集更多的 PMN，PMN 释放的蛋白酶同样对肺泡壁有破坏作用，两者共同作用，对肺气肿的发生有重要意义。以往关于的 AM 的凋亡研究都是限于动物模型的研究，而我们的研究证实了不仅是肺实质细胞凋亡异常(资料待发表)，肺内 AM 的凋亡异常也参与了 COPD 的发病。

细胞死亡包括细胞凋亡和细胞坏死，以凋亡方式处理炎症中的 PMN 是消散、控制炎症的重要手段之一。凋亡的 PMN 若不能被巨噬细胞及时吞噬清除，PMN 自发崩解后仍可释放毒性物质，介导炎症组织损

害。巨噬细胞能识别凋亡的 PMN,但不能吞噬新鲜分离的 PMN 活的 PMN。巨噬细胞对凋亡细胞的识别机制目前尚不清楚,只有 PMN 的及时凋亡及巨噬细胞的正常吞噬才能使炎症消散,而 COPD 患者急性加重期外周血 PMN 的自发性凋亡下降[9],关于 COPD 患者 AM 对凋亡的 PMN 吞噬能力的研究罕见。MPO 是 PMN 特征性酶,正常组织巨噬细胞缺乏此酶,若巨噬细胞 MPO 染色阳性,说明巨噬细胞吞噬有 PMN 颗粒,可以利用此特点来判断巨噬细胞对凋亡 PMN 吞噬情况,同时也相对反映体内 PMN 凋亡的动态变化。本研究结果显示, MPO 阳性巨噬细胞数量下降,说明 PMN 凋亡及被巨噬细胞吞噬异常参与了 COPD 的发病。

糖皮质激素能诱导胸腺细胞的凋亡[10]。我们的研究发现,较大剂量的糖皮质激素(地塞米松浓度 2 mg/L)能明显诱导 AM 的凋亡,可使 AM 的数量减少,有活性的 AM 数量也会相应减少。AM 对凋亡细胞如 PMN 等凋亡细胞、以及其他致病微生物和抗原的整体吞噬能力下降,机体的防御功能降低,机体容易发生感染。

由于大剂量的地塞米松能快速诱导 AM 凋亡,在过度炎症反应中可能具有重要意义,它可以减少 AM 的过度活化,减少炎症因子合成与分泌,从而减轻炎症损害的发生。这可能是糖皮质激素抗炎的重要机制之一,可能也是糖皮质激素治疗 COPD 急性加重期疗效显著的原因之一。临床工作中,COPD 急性发作期的患者,在接受短期的较大剂量的皮质激素治疗能减轻患者症状、缩短病程。所以,2001 年由美国国家心肺血液研究所和世界卫生组织共同制定的 COPD 全球创议也建议 COPD 急性加重期时应给予短期的糖皮质激素治疗[11]。

导致 COPD 患者的气道和肺泡腔中 AM 显著增加的原因复杂,吸烟可能是其中的一个重要因素。吸烟 COPD 患者 AM 的自发性凋亡率下降,同时其对凋亡 PMN 的吞噬能力下降,以上变化可能参与了慢性气道炎症的形成以及肺气肿的发生和发展。较大剂量的糖皮质激素能够诱导 COPD 患者 AM 的凋亡,对防止过度炎症反应的形成有意义。

参考文献:

[1] 华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组. 慢性阻塞性肺疾病诊治指南[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2002, 25(8): 453 - 460.

[2] Finkelstein R, Fraser R S, Ghezzo H, *et al*. Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1995, 152(5 Pt 1): 1666 - 1672.

[3] Jeffery P K. Structural and inflammatory changes in COPD: a comparison with asthma[J]. Thorax, 1998, 53(2): 129 - 136.

[4] 蔡 珊, 陈 平, 朱应群, 等. 慢性阻塞性肺疾病气道炎症与肺泡巨噬细胞炎症蛋白 1α、明胶酶 B 活性的研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2001 , 24(7): 429 - 432.

[5] 杨景山. 医用细胞化学与细胞生物技术[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和和医科大学联合出版社, 1990. 38 - 40.

[6] 王 慧, 程德云. 肺泡巨噬细胞与慢性阻塞性肺疾病[J]. 国外医学呼吸系统分册, 2003, 23(4): 215 - 218.

[7] Richardson B C, Lalwani N D, Johnson K J, *et al*. Fas ligation triggers apoptosis in macrophages but not endothelial cells[J]. Eur J Immunol, 1994, 24(11): 2640 - 2645.

[8] Adler B, Adler H, Pfister H, *et al*. Macrophages infected with cytopathic bovine viral diarrhea virus release a factor(s) capable of priming uninfected macrophages for activation-induced apoptosis[J]. J Virol, 1997, 71(4): 3255 - 3258.

[9] Pletz M W, Ioanas M, de Roux A, *et al*. Reduced spontaneous apoptosis in peripheral blood neutrophils during exacerbation of COPD[J]. Eur Respir J, 2004, 23(4): 532 - 537.

[10] 吴中亮, 王 通, 曹定国, 等. 地塞米松诱导胸腺细胞凋亡在神经免疫性疾病研究中的意义[J]. 中国临床康复, 2003, 7(16): 2312 - 2313.

[11] Lenfant C, Khaltaev N. Global initiative of chronic obstructive lung disease[M]. Marland: NIH Publication, 2001. 65 - 86.

(编辑 陈聪连)

(上接 1795 页)

于 1906 年首次报道。本病发病率低,大约占所有神经外胚层疾病的 1%[2]。

本病除皮肤损害外还可累及牙齿、眼、头发、中枢神经系统和肌肉骨骼系统。中枢神经系统损害发生率较高。多数学者[1-4]认为颅脑损害的原因是脑部血管闭锁、缺血和出血。MRI 和 MRS 检查可有如下表现:①皮质和皮质下区白质异常短 T1 长 T2 信号;②脑白质内软化囊腔;③大、小脑单侧萎缩和(或)胼胝体发育不全;④侧脑室扩大,室周白质 T2WI 高信号;⑤神经元标志物 N-乙酰天门冬氨酸减少,乳酸水平增高。本例患儿双额顶叶皮层下可见软化囊腔,侧脑室无扩大,室旁白质对称性略长 T2 信号,胼胝体发育良好。另外,对患儿多学科联合检查是必要的,可以发现眼、牙齿和中枢神经系统等损害,如果神经系统检查异常,则应行颅脑影像学检查。

关键词: 色素失禁症;颅脑损害

中图法分类号: R758.504 文献标识码: B

参考文献:

[1] Shah S N, Gibbs S, Upton C J, *et al*. Incontinentia pigmenti associated with cerebral palsy and cerebral leukomalacia: a case report and literature review[J]. Pediatr Dermatol, 2003, 20(6): 491 - 494.

[2] Carrascosa Romero M C, Ruiz Cano R, Medina Monzon C, *et al*. Neonatal convulsions caused by incontinentia pigmenti with left opercular dysgenesia[J]. Rev Neurol, 2003, 36(1): 36 - 39.

[3] Yoshikawa H, Uehara Y, Abe T, *et al*. One-month-old girl with incontinentia pigmenti[J]. Neurology, 1999, 53(8): 1633.

[4] Hadj Rabia S, Froidevaux D, Bodak N, *et al*. Clinical study of 40 cases of incontinentia pigmenti[J]. Arch Dermatol, 2003, 139(9): 1163 - 1170.

(编辑 薛国文)