论著

文章编号:1000-5404(2013)24-2676-05

慢性阻塞性肺疾病患者支气管肺泡灌洗液中血小板及内皮细胞微粒变化的探讨

但小苹,邱 倩,杨再兴,焦 燕,熊 玮 (400038 重庆,第三军医大学西南医院呼吸内科)

[摘要] **目的** 初步探讨慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease,COPD)患者支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid,BALF)中血小板微粒(platelet microparticles,PMPs)、内皮细胞微粒(endothelial microparticles,EMPs)数目的变化情况。**方法** 通过纤维支气管镜获取灌洗液样本,其中慢性阻塞性肺疾病急性加重期(acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease,AECOPD)组35例,慢性阻塞性肺疾病(COPD)稳定期组12例,对照组20例。将所采集的样本进行离心处理后,用相应抗体进行标记,使用流式细胞技术检测每100 μL灌洗液中以上2种微粒的数目。**结果** PMPs数目和EMPs数目在3组之间有统计学差异($P<0.05$),AECOPD组2种微粒数目均显著低于COPD稳定期组和对照组($P<0.05$,$P<0.01$),而COPD稳定期组与对照组比较2种微粒数目均无统计学差异($P>0.05$)。2种微粒数目在吸烟组与不吸烟组之间均无统计学差异($P>0.05$)。性别、年龄、体表面积与BALF中2种微粒的数目变化无关($P>0.05$)。**结论** 在COPD患者中,其BALF中PMPs、EMPs数目是减少的,并且在疾病的急性加重期更明显,BALF中2种微粒数目的减少可能与疾病分期有关。

[关键词] 慢性阻塞性肺疾病;慢性阻塞性肺疾病稳定期;慢性阻塞性肺疾病急性加重期;微粒;血小板微粒;内皮细胞微粒

[中图法分类号] R331.143;R446.19;R563.8 [文献标志码] A

Platelet and endothelial microparticles in bronchoalveolar lavage fluid of patients with chronic obstructive pulmonary disease

Dan Xiaoping, Qiu Qian, Yang Zaixing, Jiao Yan, Xiong Wei (Department of Respiratory Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the changes of the platelet microparticles (PMPs) and endothelial microparticles (EMPs) in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Methods** The lavage fluid specimens were obtained through fiberoptic bronchoscopy, including 35 cases in acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease (AECODP) group, 20 cases in normal control group (no smoking for at least 2 months) and 12 cases in stable COPD group. The specimens were centrifuged and labeled with corresponding antibodies. The numbers of the 2 types of microparticles were analyzed by flow cytometry. **Results** The numbers of PMPs and EMPs were significantly different in the 3 groups ($P<0.05$). Comparing with the stable COPD group and the control group, the numbers of the 2 types of microparticles in AECOPD group were significantly reduced ($P<0.05$, $P<0.01$). Comparing with the control group, the numbers of the 2 types of microparticles in the stable COPD group had no significant difference ($P>0.05$). There was no significant difference between the smoking group and the non-smoking group ($P>0.05$). The numbers of the 2 types of microparticles had no correlation with sex, age and body surface area. **Conclusion** The numbers of PMPs and EMPs in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with COPD are reduced, especially in the acute exacerbation period. Reduction of PMPs and EMPs may be associated with the stages of the disease.

[**Key words**] chronic obstructive pulmonary disease; stable chronic obstructive pulmonary disease; acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease; microparticles; platelet microparticles; endothelial microparticles

Corresponding author: Xiong Wei, E-mail: xiongwei64@126.com

[通信作者] 熊 玮,E-mail:xiongwei64@126.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130922.1724.004(2013-09-22)

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease,COPD)是一种可以预防和治疗的常见疾病,患病人数多、病死率高并严重影响患者的劳动能力和生活质量。目前其发病机制仍不完全明确,治疗效果也欠佳,因此对于COPD的深入研究是有必要的。微粒(microparticles, MPs)是由细胞凋亡或者受到刺激后以出芽方式产生的一种微小的、富含磷脂的细胞膜碎片,其直径从50 nm到2 μm,含有丰富的细胞表面受体以及mRNA等,具有多种生物学功能[1-3]。根据来源可将微粒分为内皮细胞微粒、血小板微粒、白细胞微粒、巨噬细胞以及淋巴细胞微粒等。目前国外对于血小板微粒(platelet microparticles,PMPs)及内皮细胞微粒(endothelial microparticles,EMPs)在COPD患者血液中的变化情况已有初步探讨,发现它们在COPD病程中具有促炎、促凝的作用,然而这2种微粒在COPD患者的支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid ,BALF)中的变化情况尚无相关研究。因此,本课题组拟初步探讨这2种微粒在COPD患者BALF中的变化情况,并分析其数目变化与疾病分期可能存在的关系,为临床工作中对COPD病情及预后的评估提供一个新的实验室检测手段。

1 资料与方法

1.1 研究对象

本课题的研究对象为第三军医大学西南医院、第三军医大学新桥医院、重庆医科大学附属第一医院2012年3月至2013年3月门诊或者住院的慢性阻塞性肺疾病患者,共47例。对照组20例来源于第三军医大学西南医院体检中心或者纤维支气管镜中心。所有病例及对照均采集其支气管肺泡灌洗液。本研究已通过当地伦理委员会审查批准,并已告知研究背景、研究目的、研究方法以及受益和风险,且与研究对象签署了知情同意书。

病例组纳入标准:①在我院或者外院明确诊断为慢性阻塞性肺疾病的患者(诊断遵照慢性阻塞性肺疾病诊断、处理和预防全球策略2011年修订版)[4]。②急性发作症状至少包括下述症状中的一种:加重的咳嗽、痰量及脓痰增加、呼吸困难加重或者发热。③对于本研究纳入的稳定期组研究对象应在3个月内未出现过疾病的急性发作。

对照组纳入标准:①健康体检包括血常规、肝肾功能、心电图、腹部超声无明显异常者;②拟在我科行纤支镜检查完善术前评估而最终未发现肺部病灶者,或肺部虽有病灶,但在高分辨率CT下显示为高密度结节影、肺部肿块影而未见渗出、增殖等病灶并且其对侧肺未见异常者。

排除标准:①晕血、晕针者;②先天性或者后天性免疫缺陷者;③自身免疫性疾病;④支气管扩张、哮喘、活动性结核者;⑤严重心功能不全、严重心律失常、频发心绞痛、肝肾疾病、糖尿病者或其他合并症;⑥近期使用免疫抑制剂、免疫调节剂或者激素等;⑦有精神、心理疾患者;⑧对麻醉药物过敏或者有其他明确纤维支气管镜检查禁忌者。

1.2 试验分组

按照疾病分期分为:慢性阻塞性肺疾病稳定期组(stable COPD)12例、慢性阻塞性肺疾病急性加重期组(AECOPD)35例;对照组20例(所有吸烟者至少在试验前2个月均停止吸烟[5])。见表1。

表1 研究对象分组情况及基本资料

组别	n	年龄(岁)	性别(男/女)	体表面积(m^2)	吸烟指数
对照组	20	71(53~83)	16/4	1.70(1.49~1.86)	400(0~800)
COPD稳定期组	12	72.5(55~85)	9/3	1.61(1.41~1.82)	500(0~800)
AECOPD组	35	75(52~87)	25/10	1.66(1.43~1.89)	400(0~1 000)

1.3 主要试剂和仪器

荧光素标记的抗人抗体包括异硫氰基(FITC)标记的E选择素、CD41以及由别藻蓝蛋白(APC)标记的CD142均为eBioscience公司产品。流式细胞检测仪accuri@ co Flow Cytometer Baceenio Static concentrate solution NO 1cp-220由第三军医大学药学院提供。

1.4 纤维支气管镜支气管肺泡灌洗液的采集

在进行纤维支气管镜支气管肺泡灌洗术前先给予阿托品0.5 mg肌内注射,使用1%利多卡因溶液对气道实施局部麻醉。所有的病例及对照组均使用奥林巴斯BF TYPE260支气管镜检查,其外径为4.9 mm,在进行支气管肺泡灌洗过程中要注意动作轻柔,用20 mL无菌生理盐水(pH 7.3)进行灌洗。将灌洗液最大限度吸出(回收率约50%),但需注意不额外增加研究对象的痛苦。对于一侧肺部有异常而对侧正常的研究对象在灌洗过程中需选择健侧的并远离患侧病灶的部位进行[6-7]。将灌洗液置入冰盒迅速送往实验室,进行离心处理。

1.5 流式细胞仪检测支气管肺泡灌洗液中2种微粒的数目

将所采集的灌洗液在4 ℃条件下,2 000×g离心10 min,每次离心后留取上清液,丢弃底部较浑浊液体,重复以上操作3次后,上清液中含有肉眼不可见的各种微粒。将处理好的液体移入EP管中(100 μL/管),在避光条件下分别加入E选择素及CD142抗体;CD41抗体及CD142抗体。震荡混匀后,上机检测。

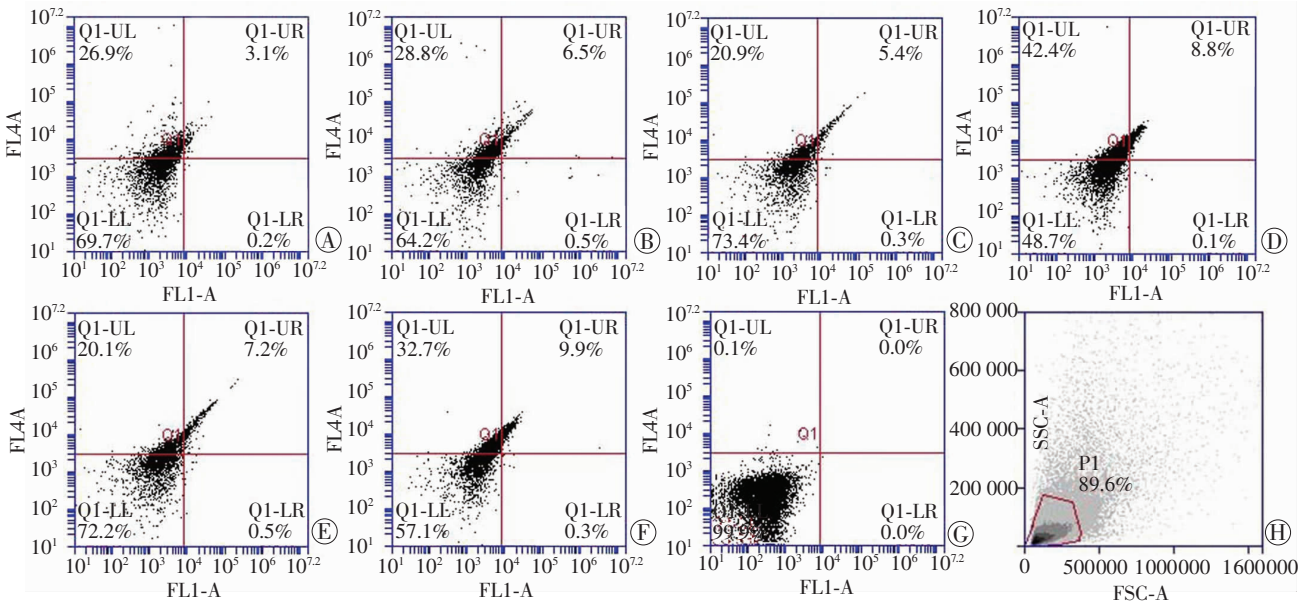
1.6 统计学方法

数据在SPSS 13.0统计软件中进行分析。研究对象的年龄、体表面积、吸烟指数、2种微粒的数目用中位数(最小值-最大值)表示。多组间比较采用多个独立样本比较的秩和检验,两两比较采用两独立样本的秩和检验。

2 结果

2.1 流式细胞仪检测各组BALF中PMPs、EMPs的含量

利用流式细胞仪检测每100 μL BALF中2种微粒的含量,结果显示在总微粒含量大致相同的情况下,AECOPD组、COPD稳定期组中PMPs、EMPs占总微粒的百分比较对照组低,即2组中PMPs、EMPs的含量也较对照组偏低。见图1。



A、B:AECOPD组;C、D:COPD稳定期组;E、F:对照组;G:阴性对照;A、C、E:血小板微粒;B、D、F:内皮细胞微粒;A～F:Q1-UR为本实验观察的微粒部分(即双阳性部分);H:P1内圈定部分为研究的微粒;Q1为门;10^1～$10^{7.2}$刻度为通道数

图1 流式细胞仪检测各组BALF中2种微粒的含量

表2 BALF中2种微粒的数目变化

微粒分类	对照组	COPD稳定期组	AECOPD组	吸烟组	不吸烟组
PMPs(个/100 μL)	623.5(74～1 531)	378.5(56～1 260)	81(29～370)	141(43～1 531)	186(29～1 265)
EMPs(个/100 μL)	693.5(43～1 847)	493(124～1 892)	202(12～1 873)	327.5(12～1 892)	350(67～1 292)

2.2 PMPs数目在各组间的比较

PMPs数目在3组之间有统计学差异($H=32.907$,$P<0.01$),AECOPD组显著低于COPD稳定期组和对照组($Z=3.917$,$P<0.01$;$Z=5.136$,$P<0.01$),而COPD稳定期组与对照组比较无统计学差异($Z=0.973$,$P=0.346$)。各组微粒的数目变化见表2。

2.3 EMPs数目在各组间的比较

EMPs数目在3组之间有统计学差异($H=12.912$,$P<0.05$),AECOPD组显著低于COPD稳定期组和对照组($Z=2.123$,$P=0.034$;$Z=3.333$,$P=0.001$),而COPD稳定期组与对照组比较无统计学差异($Z=1.168$,$P=0.243$)。见表2。

2.4 2种微粒数目在吸烟组与不吸烟组之间的比较

由于考虑到吸烟可能对支气管肺泡灌洗液中2种微粒的数目有影响,本研究同时对吸烟组及不吸烟组进行比较,发现2组之间PMPs数目无统计学差异($Z=0.564$,$P=0.573$),EMPs数目在吸烟组与不吸烟组之间也无统计学差异($Z=0.444$,$P=0.657$)。见表2。

2.5 2种微粒数目与性别、年龄、体表面积的关系

进一步分析BALF中2种微粒数目与性别、年龄、体表面积的关系,结果显示性别、年龄、体表面积与BALF中2种微粒的数目变化无关($P>0.05$)。见表3。

表3 2种微粒数目与性别、年龄、体表面积的关系(个/100 μL)

临床参数	PMPs			EMPs		
	数目	Z值	P值	数目	Z值	P值
性别		0.051	0.959		1.188	0.235
男	443.5(12～1 892)			146(56～1 531)		
女	295(43～1 242)			105(29～1 202)		
年龄(岁)		0.712	0.476		1.768	0.077
≥70	612(12～1 892)			175(31～1 260)		
<70	326(18～1 292)			105(29～1 531)		
体表面积(m^2)		0.779	0.436		0.216	0.829
≥1.7	537(13～1 873)			193.5(29～1 260)		
<1.7	329(12～1 892)			146(67～1 531)		

3 讨论

微粒被认为反映了细胞增殖、受刺激或者凋亡的一个动态平衡[5],当这种动态平衡由于各种原因被打破后将导致血循环中微粒的大量生成,它们能够携带生物活性分子至靶器官或至其他微粒,刺激产生细胞因子、生长因子、组织因子等,引发多种生物学效应,破坏机体内环境的相对稳定[8-10],并在一定程度上影响疾病的发生、发展和转归。越来越多的研究表明微粒具有促炎、促凝、调节免疫等作用,能够参与血栓形成、肿瘤、炎症、败血症、疟疾、自身免疫性疾病、血液系统疾病等[11]。而作为体内唯一由两套血液供应的肺脏,

微粒对它的影响可能是巨大的。但目前微粒在慢性气道炎症性疾病如慢性阻塞性肺疾病中的变化和作用尚不明确,因此,有必要进行深入探讨。我们的研究发现在COPD患者的支气管肺泡灌洗液中血小板微粒和内皮细胞微粒的数目均减少,在AECOPD患者中尤为明显,并且与疾病的分期有一定关系,而这一结果与已经发现的COPD患者血循环中血小板微粒、内皮细胞微粒数目是增多的并不矛盾。相反,它们之间是有一定联系的,但具体机制不明,可能与肺血管病变有关。

血小板微粒是由血小板受刺激或者凋亡后产生的,研究认为其数目的增加是血小板受到刺激的可靠标志[12]。血小板微粒可通过刺激血管内皮细胞表达趋化因子IL-8、MCP-1和MIP-1α,进而参与炎症反应。其具有的促凝作用,主要归因于它带负电荷的外表面、膜表面激活的X因子以及它能促进磷脂酰丝氨酸和组织因子的表达[13-14]。而内皮细胞微粒是由内皮细胞受到刺激或者凋亡以出芽方式产生的一种能够移动的生物"感受器",它可以通过与靶细胞的表面接触或者细胞融合的方式传递自分泌或者旁分泌信号,从而调节血管生理功能[15]。内皮细胞微粒的促凝作用可使血管壁增厚、狭窄,在临床冠状动脉粥样硬化的形成过程中具有重要意义[16]。同时有研究发现它在COPD中参与炎症反应,但具体机制不明。由于内皮细胞微粒各种亚型在COPD的肺血管和主动脉内的分布有所不同,在体内的释放也是不同的,因此其各亚型的变化可能有助于炎症的定位及炎症种类的判定[17-19]。目前已经明确的是血循环中的2种微粒在COPD的肺血管病变中起着重要作用,它们可使肺血管内膜增厚、平滑肌细胞增殖,并能使微血管功能减退,从而导致肺动脉高压[20]。

COPD肺部的特征性改变是气道、肺实质及肺血管的慢性炎症,在疾病早期肺血管的改变是以血管壁的增厚为特征,内膜增厚是最早的结构改变,接着出现平滑肌增加和血管壁炎症细胞的浸润[20],从而导致肺血管壁的狭窄、闭塞;尤其在COPD急性加重时循环中大量的血小板微粒、内皮细胞微粒的促炎、促凝作用以及长期的缺氧、多种炎症介质的参与进一步使肺血管的平滑肌、蛋白多糖和胶原增多,导致肺血管壁增厚、管腔闭塞更明显,造成肺循环的结构重组。而肺血管的病变(包括肺微小血管病变)使得能够进入气道的血循环中的血小板微粒、内皮细胞微粒数目减少,因此,在COPD患者的支气管肺泡灌洗液中是可以发现血小板微粒、内皮细胞微粒数目减少的,尤其在疾病的急性加重期减少更明显。由此可见,灌洗液中2种微粒数目的减少可能与疾病的分期有关,并且可能间接反映了COPD患者肺血管的病变情况。

综上所述,在COPD患者血循环中增多的2种微粒反而可作为促炎、促凝介质加重肺血管的病变,从而导致支气管肺泡灌洗液中2种微粒的数目减少,并且其数目的减少程度可能与疾病的不同分期有关。但这种推断需要进一步证实。

在COPD患者中,除了血循环中可以发现2种微粒数目的增多,也可以在支气管肺泡灌洗液中发现2种微粒数目的减少,并且吸烟不是导致2种微粒数目减少的直接原因。由于支气管肺泡灌洗术能获得肺泡表面衬液,而COPD存在肺部的特征性改变,因此,微粒在支气管肺泡灌洗液中的研究就显得更有意义。但相对血液的获取,支气管肺泡灌洗液的获取难度较大,同时患者受损伤的可能性也较大。目前对于2种微粒在支气管肺泡灌洗液中减少的具体机制尚不明确,有待进一步研究。我们希望通过对以上2种微粒的相关研究能与实验室常规检测手段联合参与疾病的分期、疗效以及预后的评估。

志谢 感谢本研究所有的参与者以及西南医院呼吸科重症监护室、纤支镜室及中心实验室的大力支持!同时也感谢新桥医院重症医学科以及重庆医科大学附属第一医院呼吸科重症监护室医护人员的热情帮助

参考文献:

[1] Jy W, Horstman L L, Ahn Y S. Microparticle size and its relation to composition, functional activity, and clinical significance[J]. Semin Thromb Hemost, 2010, 36(8): 876-880.

[2] Perez-Casal M, Downey C, Fukudome K, *et al*. Activated protein C induces the release of microparticle-associated endothelial protein C receptor [J]. Blood, 2005, 105(4): 1515-1522.

[3] Lacroix R, Dubois C, Leroyer A S, *et al*. Revisited role of microparticles in arterial and venous thrombosis[J]. J Thromb Haemost, 2013, 11(Suppl 1): 24-35.

[4] GOLD Executive Committee. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease(Revised 2011)[R]. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung disease, 2011[2013-10-22]. http://www.goldcopd.com.

[5] Takahashi T, Kobayashi S, Fujino N, *et al*. Increased circulating endothelial microparticles in COPD patients: a potential biomarker for COPD exacerbation susceptibility [J]. Thorax, 2012, 67(12): 1067-1074.

[6] Smyth L J, Starkey C, Vestbo J, *et al*. CD4-regulatory cells in COPD patients[J]. Chest, 2007, 132(1): 156-163.

[7] Morel O, Toti F, Hugel B, *et al*. Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26(12): 2594-2604.

[8] Montoro-Garcia S, Shantsila E, Marin F, *et al*. Circulating microparti-

cles: new insights into the biochemical basis of microparticle release and activity[J]. Basic Res Cardiol, 2011, 106(6): 911-923.
[9] Diamant M, Tushuizen M E, Sturk A, *et al*. Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? [J]. Eur J Clin Invest, 2010, 34(6): 392-401.
[10] Herring J M, McMichael M A, Smith S A. Microparticles in health and disease[J]. J Vet Intern Med, 2013, 27(5): 1020-1033.
[11] Geddings J E, Mackman N. Tumor-derived tissue factor-positive microparticles and venous thrombosis in cancer patients[J]. Blood, 2013, 122(11): 1873-1880.
[12] Phang M, Lincz L, Seldon M, *et al*. Acute supplementation with eicosapentaenoic acid reduces platelet microparticle activity in healthy subjects[J]. J Nutr Biochem, 2012, 23(9): 1128-1133.
[13] Raturi A, Miersch S, Hudson J W, *et al*. Platelet microparticle-associated protein disulfide isomerase promotes platelet aggregation and inactivates insulin[J]. Biochim Biophys Acta, 2008, 1778(12): 2790-2796.
[14] Lacroix R, Dignat-George F. Microparticles as a circulating source of procoagulant and fibrinolytic activities in the circulation[J]. Thromb Res, 2012, 129(Suppl 2): S27-S29.
[15] Curtis A M, Edelberg J, Jonas R, *et al*. Endothelial microparticles: sophisticated vesicles modulating vascular function[J]. Vasc Med, 2013, 18(4): 204-214.
[16] Lovren F, Verma S. Evolving role of microparticles in the pathophysiology of endothelial dysfunction[J]. Clin Chem, 2013, 59(8): 1166-1174.
[17] Creager M A, Luscher T F, Cosentino F, *et al*. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I[J]. Circulation, 2011, 108(12): 1527-1532.
[18] Takahashi T, Kobayashi S, Fujino N, *et al*. Differences in the released endothelial microparticle subtypes between human pulmonary microvascular endothelial cells and aortic endothelial cells *in vitro* [J]. Exp Lung Res, 2013, 39(4/5): 155-161.
[19] Thomashow M A, Shimbo D, Parikh M A, *et al*. Endothelial microparticles in mild chronic obstructive pulmonary disease and emphysema. The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis Chronic Obstructive Pulmonary Disease study[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2013, 188(1): 60-68.
[20] Tantawy A A, Adly A A, Ismail E A, *et al*. Flow cytometric assessment of circulating platelet and erythrocytes microparticles in young thalassemia major patients: relation to pulmonary hypertension and aortic wall stiffness[J]. Eur J Haematol, 2013, 90(6): 508-518.

(**收稿**:2013-07-12;**修回**:2013-09-16)
(编辑 王 红)

经验交流

文章编号:1000-5404(2013)24-2680-01

军人心理素质训练纳入军事训练的探讨

张 俐[1],张 霞[2],冯正直[1],王晓霞[1],刘云波[1] (400038 重庆,第三军医大学心理学院基础心理学教研室[1];644000 四川宜宾,四川宜宾学院化学与化工学院[2])

[**关键词**] 军人;心理素质训练;军事训练
[**中图法分类号**] R821.2 [**文献标志码**] B

军人心理素质是以生理素质为基础,人格为核心,通过个体与军事社会环境相互作用而形成的相对稳定的、基础的、衍生的、综合的,表现为挫折耐受力的心理品质[1]。军人职业的高风险和军事活动的高压力使军人承受着较大的生理和心理压力,这就需要军人有较高的心理素质来抵御高压力对心理的损伤。另外,军人行为上出现的偏差、部队发生的事故案件,许多都与官兵不良情绪逐步郁结、心理素质较差有直接关系[2]。军人心理素质训练是利用心理学原理,结合各部队的实际情况,在近似实战的环境中,有意识、有目的地培养军人优良心理素质的一系列活动[3]。心理素质训练能提升军人的心理素质和心理健康水平[4]。因此,军人心理素质训练是增强军队战斗力,保障军事作业任务顺利完成的迫切需要。可见,调查分析部队心理素质训练现状就显得尤为重要。

[**基金项目**] 国家社会科学基金军事学项目(13GJ003-112)
[**通信作者**] 刘云波,E-mail:psyatry@qq.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130923.1225.001.html(2013-09-23)

1 对象与方法

1.1 对象

整群抽取任职教育5个班次217个基础部队的727名官兵,有效回答问卷的官兵有720名,其中男性699名,女性21名,年龄16~46(22.09±5.57)岁,军龄1~29(3.47±5.39)年。

1.2 方法

在2012年9月至2013年7月期间,对某军校任职教育6个班次,217个基础部队的727名官兵进行军人心理素质训练纳入军事训练的自编问卷调查,收回有效问卷720份,有效率99.04%。将9个条目在SPSS 17.0进行了频数统计和χ^2检验。

2 结果

问卷中9个条目的统计结果见表1,通过χ^2检验,9个条目调查结果差异显著($P<0.01$)。

(下转2685页)