维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)01－0015－03

内毒素休克性肺损伤与 IFN－γ/IL－4 失衡

张明静，王兴勇，卢仲毅，匡凤梧

(重庆医科大学儿科学院,重庆 400014)

【摘 要】目的:探讨内毒素休克肺损伤与 TH1/TH2 平衡的关系。方法:采用颈静脉注入 LPS 复制大鼠急性肺损伤模型,用 ELISA 法检测其外周血单个核细胞(PBMC)产生 IFN－γ、IL－4 水平及 IFN－γ/IL－4 比值。结果:与正常对照组相比,急性肺损伤组外周血 PBMC 产生 IFN－γ 水平,IFN－γ/IL－4 比值明显升高($P<0.05$;$P<0.001$),而 IL－4 水平差异无显著性($P>0.05$),肺组织病理切片显示大鼠发生 ALI。结论:LPS 休克肺损伤时,体内存在 Th1/Th2 类细胞因子水平失衡。

【关键词】急性肺损伤;Th1/Th2;内毒素休克;细胞因子

【中国图书分类法分类号】R363.2;R563 【文献标识码】A 【收稿日期】2003－05－12

Acute lung injury induced by endotoxic shock and imbalance of Th1/Th2 type of cytokines

ZHANG Mingjing, et al

(*College of Pediatrics, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To investigate the type of imbalance of cytokines and its relations to the ALI induced by endotoxic shock. *Methods*: ALI rats model was made by injcting lipopolysacharide (LPS) into jugular vein. Enzyme－linked immunosorbent assay (ELISA) was employed to measure interferon－γ (IFN－γ) level, interleukin－4 (IL－4) level and the ratio of IFN－γ/IL－4. Pathological examination was made under optical microscope at the same time. *Results*: Compared with normal control group, the IFN－γ level, the ratio of IFN－γ/IL－4 increased significantly ($P<0.05$; $P<0.001$) whereas IL－4 level didn't change obviously ($P>0.05$). Pathological examination of lung tissue proved the presence of ALI in rats. *Conclusion*: The imbalance of Th1/Th2 type cytokines exists in the endotoxic shock－induced ALI.

【Key words】 Acute lung injury; Th1/Th2; Endotoxic shock; Cytokine

内毒素休克性肺损伤是严重创伤或感染后出现最早、发病率最高的并发症之一,目前认为其损伤机制与机体释放过度促炎介质(pro－inflammatory mediators)有关,机体在产生促炎反应的同时伴有抗炎症反应(antiinflammatory response),后者对于拮抗促炎介质的损伤作用、维持内环境稳定具有重要意义。机体炎症反应失控是急性肺损伤的本质原因[1],而促炎反应和抗炎反应失衡则是炎症反应失控的主要表现。T 辅助淋巴细胞 Th1/Th2 的功能能够反映机体促炎和抗炎反应的失衡情况,Th1 类细胞以分沁干扰素－γ(IFN－γ)等促炎细胞因子为主,Th2 类细胞以分泌白介素－4(IL－4)等抗炎细胞因子为主[2],两者的平衡实际上反映了促炎和抗炎的平衡。所以,本研究选用目前认为最能代表体内 Th1/Th2 类细胞因子的指标——IFN－γ、IL－4、IFN－γ/IL－4 比值,观察了内毒素休克性肺损伤大鼠外周血单个核细胞产生 Th1/Th2 类细胞因子水平,探讨其细胞因子失衡的类型及与发病的关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象及分组

雄性 Wistar 大鼠 20 只,体重 250～300g,由重庆医科大学实验动物中心提供,通过颈静脉注入内毒素(LPS)造成大鼠急性肺损伤模型。

随机分为 2 组:急性肺损伤组,正常对照组,各组 10 只。急性肺损伤组:用 1% 戊巴比妥钠按 30mg/kg 腹腔注射麻醉,将 LPS 按 1mg/100g(10mg/kg)经颈静脉注入,继续观察

作者介绍:张明静(1970－),女,主治医师,硕士,现工作单位为后勤工程学院医院。

基金项目:重庆市卫生局中医科研基金资助(项目号:2002－42－21)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

5h 后,无菌打开大鼠胸腔,右心室穿刺取血作单个核细胞的分离、培养,具体步骤见下(标本准备)。正常对照组:以等容积的生理盐水代替急性肺损伤组的 LPS,其余条件不变。

1.2 实验方法

1.2.1 标本准备 大鼠外周血单个细胞(PBMC)培养上清液的制备:在麻醉状态下(1%戊巴比妥钠腹腔注射 30mg/kg),无菌打开大鼠胸腔,右心室穿刺取血 5ml,肝素抗凝(5～10U/ml),用密度梯度离心法[3]分离单个核细胞(PBMC),具体步骤如下:用 PBS 液将抗凝血稀释 1 倍后缓慢加至等量的淋巴细胞分离液上,室温中,水平离心 1500r/min × 20min,收集界面单个核细胞,用 PBS 液清洗 3 次,1%苔盼蓝实验鉴定细胞活力在 95%以上后,用含 10%FCS 的 RPMI－1640 液重悬细胞并将其浓度配成 1×10^6/ml。在 24 孔培养液中各取急性肺损伤组和正常对照组的 PBMC 悬液 1ml,分别同时加入 PHA(终浓度为 100μg/ml)和 LPS(终浓度为 2μg/ml)作为刺激剂,在 5%CO_2,37℃条件下分组培养 72h,离心,无菌收集上清液,在-30℃保存,集中检测。

大鼠肺组织病理切片的制备:无菌打开大鼠胸腔后,解剖观察肺大体标本;同时取大鼠左肺下叶,甲醛固定 24h,石蜡包埋切片,常规 HE 染色,观察肺组织病理改变。

1.2.2 检测方法 上清液 IFN－γ及 IL－4 水平测定采用以抗体夹心 ELISA 法(药盒购自深圳晶美生物工程有限公司)。

1.2.3 光镜下肺组织病理学观察。

1.3 统计学方法

结果用均数±标准差表示,采用 SAS 软件处理,进行正态性检验和方差齐性检验,对于方差齐的资料用两样本均数比较的 t 检验,不齐者用 t' 检验或经数据转换使方差齐后再作 t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结 果

2.1 急性肺损伤组与正常对照组细胞因子水平的比较

表 1 急性肺损伤组与正常对照组细胞因子水平的比较($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

分 组	IFN－γ(pg/ml)	IL－4(pg/ml)	IFN－γ/IL－4
正常对照组	52.53±20.39	1.85±0.39	28.32±8.97
急性肺损伤组	249.00±72.75	1.82±1.20	164.30±89.54
t	2.61	0.03	5.08
P	<0.02	>0.05	<0.001

2.2 肺大体观察及肺组织病理学切片(见图 1、2)

正常对照组:大体观察大鼠肺外观色泽粉红,无明显异常改变。肺组织病理学切片显示肺泡腔清晰,结构完整,肺泡隔均匀一致,壁光滑,可见少量白细胞,肺泡腔中无渗出液或渗出的白细胞。

急性肺损伤组:大体观察肺体积增大,脏层胸膜张力较高,色泽暗红,可见包膜下点、片状出血,切面疏松,有黄色或淡红色肺水溢出。肺组织病理学切片显示肺组织毛细血明显扩张、充血,白细胞附壁,肺泡隔明显增厚,大量白细胞渗出、聚集,肺泡腔中可见渗出液和漏出聚集的红细胞,部分肺泡腔萎缩不张。

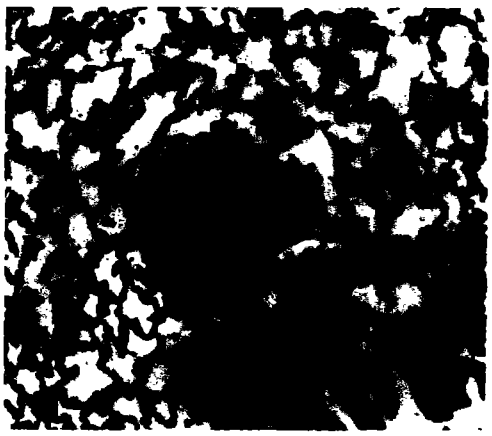


图 1 急性肺损伤组(HE× 100)



图 2 正常对照组(HE×100)

3 讨 论

细胞因子(cytokines,CKs)是指由活化的免疫细胞和某些基质细胞分泌的,具有多种生物学活性,能够介导和调节免疫及炎症反应的小分子蛋白质或多肽,是一类非特异性免疫效应物质。细胞因子在机体内构成一个统一的网络,并影响神经系统、内分泌系统、免疫系统大网络的运作 。感染发生后,体内出现复杂的细胞因子改变,细胞因子网络的平衡被破坏,某种或某些细胞因子产生或其受体表达异常。无论是细胞因子增加或减少,均可导致病理性改变,

维普资讯 http://www.cqvip.com

甚至造成严重的多器官损伤。

业已证明,G^-细菌是诱发急性肺损伤的主要因素之一,而G^-细菌的毒性表现与其细胞壁中的脂多糖成分即内毒素(LPS)密切相关。LPS是强有力的致伤剂,具有激活免疫应答的能力,使免疫细胞活化分泌细胞因子。在实验中观察到:LPS进入大鼠体内后5h,外周血单个核细胞培养上清液中Th1类细胞因子(IFN-γ)水平升高,而Th2类细胞因子(IL-4)水平差异无显著性,其比值IFN-γ/IL-4明显长高;病理切片证实大鼠发生急性肺损伤。这说明在LPS休克时,体内促炎因子与抗炎因子相互作用的失衡是导致LPS肺损伤的重要机制。

IFN-γ是创伤或感染后机体最早产生的多功能细胞因子之一,它具有巨噬细胞激活因子的作用,协同诱导巨噬细胞TNF-α及诱导型NO合酶(iNOS)表达。TNF-α能直接损伤肺血管内皮细胞和肺泡Ⅱ型上皮细胞[4],同时又诱导内皮细胞和巨噬细胞释放IL-1、IL-6、IL-8等细胞因子,通过再激活炎症效应细胞,释放更多的炎性因子,"级联放大"炎症信号[5]。LPS及炎症因子诱导NOS活性增加,促使NO大量释放,出现持续性低血压和细胞基因毒性效应,引起肺组织损伤。此外,IFN-γ能显著增加单核细胞、巨噬细胞、血管内皮细胞等MHCⅡ类抗原的表达,增强抗原递呈细胞与T细胞的相互作用,使细胞毒性T细胞功能增强,导致肺组织细胞损害。而IL-4则具有抗炎活性,能够抑制LPS介导的炎性细胞因子产生[6]。如果两者能达到平衡则机体内环境保持稳定,组织损伤程度较轻。在实验中,促炎因子IFN-γ水平显著升高,而抗炎因子IL-4水平无显著变化,其比值IFN-γ/IL-4明显升高,说明机体发生了强烈的促炎反应,而抗炎因子分泌不足,导致炎症反应平衡,引起组织损伤。所以,可以通过检测Th1/Th2的平衡变化,选择适当的时机,针对Th1类细胞活性增强探索有效的免疫调节措施,恢复促炎/抗炎平衡,这可能是防治急性肺损伤的重要方向。

至于急性肺损伤时促炎反应占优势的机制,目前认为与病原体激活树突状细胞(dendritic cells, DCs)产生IFN-γ促进因子的强弱密切相关[7],同时也与机体内毒素天然增敏系统和解毒物质相互作用的失衡有关。

参 考 文 献

[1] Faist E, Schinkel C, Zimmer S. Update the mechanism of immune suppression of injury and immune modulation [J]. World J Surg, 1996; 20: 454-459.

[2] Puyana J C, Pellegrini J D, Kumar De A, et al. Both T-helper-1- and T-helper-2-type lymphokines are depressed in posttrauma anergy [J]. Trauma, 1998; 44: 1037-1046.

[3] 刘恭植,主编. 现代医学免疫学[M]. 第1版,南京:江苏科学技术出版社,2000; 302-303.

[4] Marsh C B, Wewer M D. The pathogenesis of sepsis: factor that modulate the response to gram-negative bacterial infection[J]. Clin Chest Met, 1996; 17(2): 183-197.

[5] Okusawa S, Gelfand J A, Ikejima T, et al. Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits: synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition[J]. Clin Invest, 1988; 81: 1162-1172.

[6] Li B, Tournier C, Divis RJ, et al. Regulation of IL-4 expression by the transcription factor Jun B during T helper cell differentiation [J]. EMBO J, 1999; 18(2): 420-432.

[7] Dragana Jankovic, Liu Z G, William C G, et al. Th1- and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways[J]. Trends in Immunology. 2001; 22(8): 450-457.