维普资讯 http://www.cqvip.com

311-313

高糖状态对大鼠肺泡巨噬细胞释放NO和TNF的影响

临床学院 内分泌科 沈兴平* 舒昌达 何 军

R587.202
R563.02

提 要 从正常Wistar大鼠肺中分离出肺泡巨噬细胞，在体外正常和高糖状态下培养并分别以干扰素(IFNα—2b)、卡介苗(BCG)以及干扰素和卡介苗联合刺激肺泡巨噬细胞，测定其释放一氧化氮(NO)和肿瘤坏死因子－α(TNF－α)量。结果显示，高糖状态下BCG刺激肺泡巨噬细胞时，其NO和TNF－α释放量明显低于对照组($P<0.01$);IFNα－2b刺激肺泡巨噬细胞时，其NO和TNF－α释放量与对照组无差别($P>0.05$);IFNα－2b与BCG协同刺激肺泡巨噬细胞时，其NO和TNF－α释放量明显低于对照组($P<0.01$)。由此表明高糖状态下，肺泡巨噬细胞释放NO和TNF－α减少，可能是导致糖尿病患者肺部易感染的一个重要原因。

NO TNF 高糖 糖尿病，肺部感染
关键词 肺泡；巨噬细胞；一氧化氮；肿瘤坏死因子
中图分类号 R363.1

肺部感染是糖尿病患者死亡的重要原因，其机制尚不清楚。肺泡巨噬细胞(AM)作为肺防御系统中重要的非特异性细胞免疫的效应细胞，在清除侵入细菌过程中起重要作用[1]。近年来一氧化氮(NO)以其活跃而广泛的生化性质，参与杀菌、杀肿瘤细胞并介导一系列免疫病理过程，而引起人们高度重视。由巨噬细胞分泌的肿瘤坏死因子(TNF－α)，在调节AM杀菌、炎症反应中亦起重要作用。鉴于目前广泛应用的致糖尿病动物模型药物中链脲菌素和四氧嘧啶均可对骨髓单核/巨噬细胞前体有直接毒性作用[2,3]，因而，本研究拟通过体外模拟糖尿病高糖状态培养AM，观察NO和TNF－α的变化，探讨糖尿病肺部感染的发病机制。

1 材料与方法

1.1 AM的分离和培养

取健康Wistar大鼠(重庆医科大学实验动物中心提供)，股动脉放血处死。用37℃无菌生理盐水行支气管肺泡灌洗(7ml×10次)，回收液集中保存于无菌瓶中，400g离心10min，去掉上清液，沉淀细胞用含10%小牛血清的DMEM培养液(GIBCO公司产品)混匀，制成细胞悬液，置37℃培养箱中培养2h，弃掉培养液，贴壁细胞即为AM(台盼兰染色，证明AM存活率在90%以上，分类计数AM纯度在97%左右)。然后分别用原DMEM培养液和高糖培养液(含葡萄糖20mmol/L)混匀制成细胞悬液，调整细胞数为10^6个/ml，加入24孔培养板(COSTAR产品)中，每孔1ml。分为对照组和高糖组。

1.2 生物免疫制剂的应用

参照国内白咸勇方法[4]并加以改进。卡介苗(BCG，卫生部成都生物制品研究所提供)以生理盐水1:2稀释。干扰素α－2b(IFNα－2b,Brand of IFN alfa－2b, Schering－Plough (China) Ltd提供)用1ml无菌注射用水配制成1000u/μl。在对照组和高糖组中，各孔均分别加入BCG(按5μl/10^6AM，10μl/10^6AM，20μl/10^6AM)、IFNα－2b(按2500u/10^6AM，5000u/10^6AM，10000u/10^6AM)、IFNα－2b＋BCG(按2500u/10^6AM＋5μl/10^6AM，5000u/10^6AM＋10μl/10^6AM、10000u/10^6AM＋20μl/10^6AM)，每种浓度作10孔平行，培养12h后，收集上清液置－70℃冻存待测。

1.3 NO测定

1.3.1 测定原理[5]

亚硝酸/硝酸根离子(NO_2^-/NO_3^-)为NO的稳定产物，已被证实为指示NO产生水平的优良指标，其原理为：

亚硝酸盐＋对氨基苯磺酸$\xrightarrow{\text{重氮反应}}$重氮化合物

重氮化合物＋α－萘－乙二胺$\xrightarrow{\text{偶氮反应}}$偶氮化合物(红色)

1.3.2 测定

采用北京东亚免疫技术研究所提供的一氧化氮代谢产物亚硝酸盐浓度测定试剂盒进行。

1.4 TNF－α测定

TNF－α放免药盒由北京东亚免疫技术研究所提供，按试剂盒说明书，采用液相竞争法测定(该法批内CV5%，批间CV8%)。

1.5 统计学处理

实验数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，进行t检验。

2 结果

在对照组和高糖组未加用生物免疫制剂刺激

* 男，1963－01出生，博士生

维普资讯 http://www.cqvip.com

AM时，其AM释放NO量为2.37±1.28μmol/10^6AM，2.27±1.48μmol/10^6AM两组无差异($P>0.05$)；AM释放TNF－α量为0.21±0.11ng/10^6AM，0.20±0.09ng/10^6AM，两组无差异($P>0.05$)。在用BCG刺激AM时，高糖组AM释放NO和TNF－α量均低于对照组($P<0.01$)(见表1、4)；在IFNα—2b刺激AM时，高糖组AM释放NO和TNF－α量与对照组比较无差异($P<0.01$)(见表2，5)；而IFNα－2b和BCG协同作用于AM时，高糖组AM NO和TNF－α释放量均低于对照组($P>0.05$)(见表3、6)。在对照组用不同浓度BCG和不同浓度IFNα－2b＋BCG刺激AM时，BCG刺激AM NO和TNF－α释放量明显低于IFNα—2b＋BCG刺激AMNO和TNF－α释放量($P<0.01$)；在高糖组，用不同浓度BCG和不同浓度IFNα－2b＋BCG刺激AM时，IFNα－2b＋BCG刺激AM NO和TNF－α释放量明显高于BCG刺激AM NO和TNF－α释放量($P<0.01$)。

3 讨论

本实验结果表明在高糖状态下，BCG刺激AM释放NO和TNF－α量均低于对照组，BCG与IFNα－2b协同刺激时，其NO和TNF－α量也明显低于对照组。其原因可能是在高糖状态下，AM表面Fc受体数量增加，但其亲合力降低，抑制受体后介导的代谢过程[6]；高糖状态可增加蛋白激酶C活性，使cPLA$_2$(cytosolic phospholipase A)$_2$活性增加，继而增加花生四烯酸和前列腺素E_2水平，抑制AM膜上Na/K ATP酶活性，导致供应膜代谢及运动所需要的能量减少，AM膜流动性下降[7]；此外，高糖状态下葡萄糖可与BCG表面C_3补体竞争性结合，抑制AM对BCG的吞噬[6]；以上三个方面共同使BCG活化AM作用下降，至NO和TNF－α释放减少。同时表明生物免疫制剂协同刺激AM

表1 BCG对AM释放NO的影响($n=10, \bar{x}\pm s$)

	(NO μmol/10^6AM)			
	BCG (0 μl/10^6AM)	BCG (10 μl/10^6AM)	BCG (5 μl/10^6AM)	BCG (20 μl/10^6AM)
对照组	2.37±1.28	4.41±2.56	3.98±1.61	4.97±1.17
高糖组	2.27±1.48	3.07±1.82	2.57±1.01	3.22±1.58
P值	$P>0.05$	$P<0.01$	$P<0.01$	$P<0.01$

表2 IFNα－2b对AM释放NO的影响($n=10, \bar{x}\pm s$)

	(NO μmol/10^6AM)			
	IFNα－2b 0u/10^6AM	IFNα－2b 2500u/10^6AM	IFNα－2b 5000u/10^6AM	IFNα－2b 10000u/10^6AM
对照组	2.37±1.28	5.06±2.51	5.79±1.24	6.43±1.83
高糖组	2.27±1.48	4.90±1.36	5.49±1.94	5.90±1.62
P值	$P>0.05$	$P>0.05$	$P>0.05$	$P>0.05$

表3 IFNα－2b与BCG协同对AM释放NO的影响($n=10, \bar{x}\pm s$)

	(NO μmol/10^6AM)							
	IFNα－2b＋BCG		IFNα－2b＋BCG		IFNα－2b＋BCG		IFNα－2b＋BCG	
	0	0	2500	5	5000	10	10000	20
	u/10^6AM	μl/10^6AM	u/10^6AM	μl/10^6AM	u/10^6AM	μl/10^6AM	u/10^6AM	μl/10^6AM
对照组	2.37±1.28		7.92±1.69		8.99±1.07		9.23±1.16	
高糖组	2.27±1.48		4.78±1.43		5.81±1.22		6.99±1.49	
P值	$P>0.05$		$P<0.01$		$P<0.01$		$P<0.01$	

表4 BCG对AM释放TNF－α的影响($n=10, \bar{x}\pm s$)

	TNF－α(ng/10^6AM)			
	BCG (0 μl/10^6AM)	BCG (5 μl/10^6AM)	BCG (10 μl/10^6AM)	BCG (20 μl/10^6AM)
对照组	0.21±0.11	0.41±0.06	0.42±0.08	0.44±0.04
高糖组	0.20±0.09	0.22±0.08	0.25±0.11	0.29±0.05
P值	$P>0.05$	$P<0.01$	$P<0.01$	$P<0.01$

表5 IFNα－2b对AM释放TNF－α的影响($n=10, \bar{x}\pm s$)

	TNF－α(ng/10^6AM)			
	IFNα－2b 0u/10^6AM	IFNα－2b 2500u/10^6AM	IFNα－2b 5000u/10^6AM	IFNα－2b 10000u/10^6AM
对照组	0.21±0.11	0.42±0.07	0.45±0.07	0.48±0.05
高糖组	0.20±0.09	0.39±0.08	0.42±0.06	0.46±0.09
P值	$P>0.05$	$P>0.05$	$P>0.05$	$P>0.05$

表6 IFNα－2b与BCG协同对AM释放TNF－α的影响($n=10, \bar{x}\pm s$)

	TNF－α(ng/10^6AM)							
	IFNα－2b＋BCG		IFNα－2b＋BCG		IFNα－2b＋BCG		IFNα－2b＋BCG	
	0	0	2500	5	5000	10	10000	20
	u/10^6AM	μl/10^6AM	u/10^6AM	μl/10^6AM	u/10^6AM	μl/10^6AM	u/10^6AM	μl/10^6AM
对照组	0.21±0.11		0.59±0.10		0.70±0.07		0.74±0.08	
高糖组	0.20±0.09		0.40±0.05		0.44±0.07		0.52±0.04	
P值	$P>0.05$		$P<0.01$		$P<0.01$		$P<0.01$	

维普资讯 http://www.cqvip.com

时，AM释放NO和TNF－α量均高于单一制剂刺激。

我们推测，在糖尿病高糖状态下，外来病原菌侵入肺脏时，触发AM释放NO量降低，使病原菌胞内铁丢失减少[8]，破坏DNA、线粒体呼吸链电子传递和干扰葡萄糖代谢作用减弱[9]，同时NO与超氧自由基生成具有强大杀伤微生物作用的超氧硝基明显减少，导致侵入病原菌易于繁殖和生长。在高糖状态下，AM释放TNF－α下降可致AM释放反应性氧介质(如过氧化物、过氧化氢及氢氧基等)和其它重要免疫调节介质减少[10]；激活中性粒细胞能力下降，致中性粒细胞杀菌作用减弱，肺部抗感染能力下降，易于感染。在干扰素诱导NO合成过程中，TNF常作为第二信号存在，TNF下降可进一步减少AM释放NO，削弱AM的杀菌作用。

以往研究多认为，糖尿病患者肺部感染与AM的"呼吸爆发"被抑制有关[11]。本研究表明在高糖状态下存在AM释放NO和TNF－α障碍。因此，我们认为，糖尿病高糖状态下AM抗菌能力下降，不仅与氧化应激变化有关，而且可能还与NO和TNF－α释放减少有关，两方面互相影响，并与其它机制形成错综复杂的关系，从多种机制削弱AM抗菌防御系统，导致糖尿病患者易出现肺部感染。在活体中，有作者观察到百日咳患者中肺部NO增加，可以致肺损伤，故关于糖尿病患者肺病变与NO的关系，值得进一步研究。

参 考 文 献

1.Lohmann－Matthes ML, et al. Eur Respir J 1994;7:1678
2.Nichols WK, et al. Clin Exp Immunol 1981;46:627
3.Nichols WK, et al. Diabetologia 1979;16:51
4.白咸勇，等.解剖学杂志 1994;4:331
5.Stuehr DJ,et al. Proc Natl Acad Sci USA 1985:82:7738
6.Hostetter MK. Diabetes 1990;39:271
7.Xia P, et al. J Clin Invest 1995;96:733
8.Nathan C. FASEB J 1992;6:3051
9.Wink DA, et al. Science 1991;254:1001
10.Khan IA, et al. J Immunol 1996; 156:636
11. Mohsenin V, et al. J Appl Physiol 1990;6:2384

(收稿日期 1997－04－23)

Effect of high glucose level on release of nitric oxide and tumor necrosis factor－α in rats alveolar macrophages

Shen Xinping, et al
Department of Endocrinology, College of Climical Medicine

The alveolar macrophages were isolated from Wistar rat lung, and cultured in normal and high glucose condition, and then stimulated respectively with IFNα－2b, BCG and the combination of IFNα－2b and BCG. The concentration of nitric oxide(NO) and tumor necrosis factor－α (TNF－α) in cultured rat alveolar macrophages was evaluated. The results showed that the volume of NO and TNF－α produced by alveolar macrophages after stimulation with BCG was significantly lower in the high glucose group than in the control ($P<0.01$), and the volume of NO and TNF－α produced by alveolar macrophages after stimulation with IFNα－2b was not different between the high glucose group and the control group ($P>0.05$). Under the effect of IFNα－2b and BCG, the volume of NO and TNF－α produced by alveolar macrophages in high glucose conditions decreased significantly in comparison with control group. These data indicate that the decrease of NO and TNF－α produced by alveolar macrophages in high glucose condition might be an important factor enhancing the development of pulmonary infection of diabetes mellitus.

KEY WORDS Pulmonary alveolar; Macrophages; Tumor necrosis factor－α; Nitric oxide