DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.19.027
第26卷第19期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 19
1762 2004年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)19-1762-03

卡介苗多糖核酸对肺结核患者肺泡巨噬细胞功能的调节

李敏超[1],张和生[1],汤为学[2],邓 锋[3] (重庆医科大学:[1]附属第二医院呼吸内科,重庆 400010,[2]主理学教研室,[3]附属第一医院呼吸内科,重庆 410016)

提 要:目的 探讨肺结核患者肺泡巨噬细胞(alveolar macrophage, AM)分泌IL-10、IL-12水平的变化及卡介苗多糖核酸(bacillus calmette guerin-polysaccharide nucleic acid, BCG-PSN)对AM吞噬功能及其分泌细胞因子能力的干预作用。方法 从43名肺结核患者和20名健康者的支气管肺泡灌洗液(bronchoalvedar lavage fluid, BALF)中获取AM,用双抗体夹心酶联免疫吸附(ELISA)法测定经脂多糖刺激AM培养上清液中IL-10、IL-12的水平。肺结核患者AM培养液中加入BCG-PSN,观察其对AM吞噬功能及分泌IL-10、IL-12能力的影响。结果 肺结核患者AM分泌IL-10水平显著高于正常人,而IL-12则无升高优势。BCG-PSN能增强肺结核患者AM的吞噬功能,同时提高其分泌IL-12的能力,降低IL-10的分泌水平。结论 BCG-PSN能增强肺结核患者AM的吞噬功能,同时提高细胞免疫功能。是一种对AM活性有显著效果的免疫调节剂,对于肺结核的辅助治疗有良好的应用前景。

关键词:肺;结核;白细胞介素12;白细胞介素10;卡介苗多糖核酸
中图法分类号:R392.12;R392.7;R521.05 文献标识码:A

Effects of BCG-PSN on pulmonary alveolar macrophage function in pulmonary tuberculosis patients

LI Min-ehao[1], ZHANG He-sheng[1], TANG Wei-xue[2], DENG Feng[3] ([1]Department of Respiratory Diseases, Second Affiliated Hospital, Chongqing 400010; [2]Department of Pathophysiology, [3]Department of Respiratory Diseases, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To explore the changes of IL-10 and IL-12 released by pulmonary alveolar macrophages (AMs) in patients with pulmonary tuberculosis (TB), and the effects of BCG-PSN on phagocytosis and cytokine-releasing capacities of AMs. Methods AMs were collected from bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of 43 pulmonary TB patients and 20 normal control volunteers. The production of IL-10 and IL-12 in the culture supernatants of lipopolysaccharide-stimulated AMs was determined using sandwich ELISA. BCG-PSN was added into the culture supernatants of AMs from pulmonary TB patients, and the effects of BCG-PSN on the phagocytosis and cytokine-releasing capacities of AMs were determined. Results The level of IL-10 produced by AMs in pulmonary TB patients was higher than that in the controls, but no increase of IL-12 was found. BCG-PSN could improve the phagocytosis and cytokine-releasing capacities of AMs from pulmonary TB patients, but reduce the production of IL-10. Conclusion BCG-PSN could enhance the phagocytosis of AMs, and improve the cell-mediated immunological function. BCG-PSN, as an immunomodulator, has remarkable effects on the activities of AMs. BCG-PSN can be used as an effective adjuvant in tuberculosis treatment.

Key words: tuberculosis; pulmonary; interleukin-10; interleukin-12; BCG-PSN

从20世纪80年代以来,结核病呈现回升趋势,主要原因是耐多药结核病(MDR-TB)流行、人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)感染、免疫抑制剂的使用以及高龄人口机体免疫力低下等,使结核分支杆菌感染发展成为难治性倾向[1]。因此针对提高机体的免疫力,人们一直在探索使用生物免疫制剂来辅助治疗结核[2,3]。肺是最易被结核杆菌侵犯的器官,肺泡巨噬细胞(alveolar macrophage, AM)作为非特异性防御的第一道防线,起着重要的作用,而肺结核病变局部AM免疫状态方面的报道相对较少。我们对43名肺结核患者的病变局部进行支气管肺泡灌洗,对肺结核病灶局部AM分泌IL-10、IL-12的情况进行分析,并观察长沙九芝堂研制生产的卡介苗多糖核酸(BCG-PSN)-斯奇康注射液对AM功能的干预作用。

作者简介:李敏超(1971一),女,四川省新都县人,硕士,主治医师,主要从事 肺癌的早期诊断方面的研究。电话:(023)63704597

收稿日期:2003-07-14;修回日期:2003-09-25

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1　材料与方法

1.1　标本来源

所有对象在检查前 3 个月内均未用过皮质类固醇类药物及免疫调节剂,均无自身免疫性疾病、炎性肠道疾病、慢性肝病、哮喘及其它变态反应性疾病,均为不吸烟者。肺结核组 43 例,其中男 28 例,女 15 例,年龄 18～63(42±18)岁,为经纤维支气管镜找到结核杆菌或术后证实为肺结核者。纤维支气管镜检查前均未行抗痨治疗。正常组 20 例,其中男 13 例,女 7 例,年龄 20～56(37±14)岁,包括因咳嗽、喉部异物感等原因作纤维支气管镜,但镜检及临床诊断均无明显病变者。以上受试者均为 2001 年 2 月至 2002 年 4 月重庆医科大学附二院及附一院肺科住院病人。

1.2　试剂与方法

1.2.1　灌洗部位　　严格由纤维支气管镜技术熟练者专门进行,按照日本 BAL 有关指针方案进行操作。各组均选取右肺中叶或左肺舌叶作为灌洗部位以获取 AM,肺结核组均选取有病灶一侧。

1.2.2　支气管肺泡灌洗液(BALF)中 AM 的分离、培养　BALF 过滤,离心、D-Hanks 液漂洗离心沉淀的细胞成分 3 次。用含 20% BS 的 RPMI1640 培养液悬浮细胞,放入 37 ℃,5% CO_2 及饱和湿度的培养箱中,孵化 2 h。用 37 ℃的 RPMI1640 培养液洗涤细胞,去除未贴壁细胞。加入胰酶使贴壁的 AM 脱落,离心、漂洗 3 次,用含 20% BS 的 RPMI1640 培养液悬浮细胞,调整细胞浓度至 1×10^6/ml。上述 AM 悬液注入 24 孔培养板,每孔 1 ml,加入脂多糖(LPS,Sigma 公司产品)1 μg/ml。培养 24 h 后取培养液离心,将上清液置 -20 ℃保存备测。

1.2.3　AM 吞噬功能的测定　　AM 培养液分为 2 组,未加入斯奇康组为对照组,AM 培养液中加入 0.1 ml 斯奇康共同孵育 18 h 组为实验组(斯奇康由长沙九芝堂研制生产,批号:国药准字 S20020019)。实验组及对照组 AM 培养液中加入鸡红细胞悬液 0.1 ml,共同孵育 3 h 后离心,沉渣涂片,姬姆萨染色,计数 200 个 AM 吞噬鸡红细胞的巨噬细胞数。

1.2.4　IL-10、IL-12 的检测　　采用双抗体夹心酶联免疫吸附(ELISA)法测定 AM 培养液对照组及加入斯奇康组中 IL-10、IL-12 的水平。ELISA 试剂盒购自深圳晶美生物工程有限公司。

1.3　统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SAS6.12 软件,两组间比较采用 t 检验。

2　结果

2.1　正常组及肺结核组 AM 分泌 IL-10、IL-12 水平的测定

肺结核组 AM 培养上清液中 IL-10 的水平为(120.41±24.50) pg/ml,显著高于正常组(92.67±11.22) pg/ml ($P<0.05$);AM 培养上清液中 IL-12 的水平正常组为(243.35±40.41) pg/ml,肺结核组为(223.17±29.28) pg/ml,二者无显著差异($P>0.05$)。

2.2　斯奇康对肺结核患者 AM 吞噬率及分泌 IL-10、IL-12 能力的影响

AM 培养液中加入斯奇康组 AM 的吞噬率为(46.48±3.88)%,显著高于对照组(23.10±2.37)% ($P<0.05$)。AM 培养液中加入斯奇康组其 IL-10 的水平为(98.20±21.37)pg/ml,较对照组 IL-10 的水平(120.41±24.50) pg/ml 显著降低($P<0.05$)。AM 培养液中加入斯奇康组其 IL-12 的水平为(281.20±47.35)pg/ml,较对照组 IL-10 的水平(243.35±40.41) pg/ml 显著升高($P<0.05$)。

3　讨论

结核病的发生、发展与机体的免疫状态有密切关系,机体可通过调动免疫机制来抑菌或杀菌。在结核的免疫过程中,Th_1、Th_2 细胞及其释放的细胞因子起到很重要的作用。Th_1/Th_2 的平衡消长是机体免疫反应调节的基本方式,并可随不同条件的变化发生反应类型的漂移或优势改变[4]。Th_1 通过分泌干扰素-γ(IFN-γ)、IL-2 介导细胞免疫激活巨噬细胞杀灭细胞内病原体,提高机体防卸功能。Th_2 分泌 IL-5、IL-4、IL-10 介导体液免疫,抑制巨噬细胞活性,促进感染发展或慢性化。结核分支杆菌是 Th_1 反应的诱导物,往往导致 Th_1 型细胞因子占优势,以满足机体对结核抗原刺激的应答[5]。但一些观察显示,结核病人并非都存在绝对的 Th_1/Th_2 极化状态或 Th_1 优势,有的呈现 Th_0 样分泌或 Th_2 优势[6～8]。我们的研究表明:活动性肺结核病灶局部与正常人比较 IL-10 呈现出较高水平。IL-10 通过抑制巨噬细胞产生 IL-12 而抑制 Th_1 细胞的增殖,这显示活动性肺结核病灶局部伴随着细胞免疫功能的受损和细胞因子表达的改变。病灶局部 AM 分泌的 IL-12 水平与正常人比较无明显变化,可能有两方面的原因:①结核杆菌诱导 Th_1 反应,产生高水平的 IFN-γ,IFN-γ 可促进单核-巨噬细胞产生 IL-12,所以结核分支杆菌感染的刺激能增加内源性 IL-12 的产生,而 IL-12 水平的升高往往出现在结核分支杆菌感染的初期[9];②局部 AM 分泌较高水平 IL-10 对 IL-12 的产生起一定的抑制作用。有研究报道[1] IL-12 诱导 IFN-γ 产生,促进 Th_1 细胞反应,改变了 Th_1/Th_2 平衡,对结核分支杆菌感染小鼠产生保护效应。另外 IL-12 与抗结核药物联用,在抗结核方面具有协同作用[10]。由此可见,活动性肺结核局部有以 IL-10 升高为特征的体液免疫功能增强,而细胞免疫功能存在缺陷。IL-10 通过对 AM 活性的抑制在宿主抗结核感染中起"负"作用[11],而保护性细胞因子 IL-12 却无升高优势。活动性肺结核局部细胞因子的变化不利于机体对结核杆菌的有效清除。

20 世纪 70 年代,卡介苗多糖核酸(BCG-PSN)即用于临床,但临床效果不甚理想,且少数可诱发稳定结核病灶复发,研究表明可能是诱发了迟敏反应,以及产生了过多的肿瘤坏死因子所致。斯奇康是在过去的

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

BCG-PSN 基础上,采用热酚法去掉了可诱导迟敏反应发生的菌体蛋白质,再用乙醇沉淀提取免疫活性较强的菌体脂多糖成分,使其更加精纯。从本研究观察到,斯奇康可提高 AM 的吞噬功能,且能使 AM 的细胞因子发生变化:IL-10 分泌水平降低,同时 IL-12 的分泌水平升高。IL-10 的水平下降,使 AM 产生 IL-12 的抑制作用被削弱。在 Th_0 分化为 Th_1 细胞的过程中 IL-12 发挥中心作用,IL-12 水平的升高和 IL-10 水平的下降可能使病灶局部呈现 Th_1 极化状态。所以斯奇康可以通过调节结核灶局部微环境的细胞因子平衡,增强细胞免疫功能及 AM 的吞噬功能,对防御结核有一定价值。斯奇康在临床上作为免疫调节剂辅助治疗结核的主要给药途径为肌注及胸腔内注射,本研究为我们治疗 MDR-TB 提供了另一治疗的新思路即通过纤维支气管镜注入异烟肼等抗痨药物后,注入一定剂量的斯奇康可能有利于机体对局部结核杆菌的杀灭和清除。临床上在有效的化疗方案治疗下仍然不能杀灭持留菌时,该免疫疗法可能对恢复保护性免疫助一臂之力。但近期有学者认为分支杆菌类免疫刺激剂可持续活化淋巴细胞,延长胸液淋巴细胞凋亡时程,从而减缓结核性胸液的消退进程[12]。所以斯奇康治疗肺结核的机制、不同类型肺结核的治疗时机、最佳剂量及给药途径尚值得更进一步的研究。

参考文献:

[1] 张天托, 唐英春, 张扣兴, 等. 白细胞介素-12 调节小鼠 Th_1/Th_2 的抗结核分支杆菌感染研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2000, 23(6): 358 - 360.

[2] Jacobs M, Fick L, Allie N, *et al*. Enhanced immune response io Mycobacterium bovis bacille calmette guerin (BCG)-infected IL-10-deficient mice [J]. Clin Chem Lab Med, 2002, 40(9): 893 - 902.

[3] Palendira U, Kamath A T, Feng C G, *et al*. Coexpression of interleukin-12 chains by a self-splicing vector increases the protective cellular immune response of DNA and Mycobacterium bovis BCG vaccines against Mycobacterium tuberculosis[J]. Infect Immun, 2002, 70(4): 1949 - 1956.

[4] 马 靖, 何 冰. Th_1/Th_2 反应与人类肺部疾病[J]. 国外医学呼吸系统分册, 2000, 20(2): 67 - 69.

[5] 钟 定, 董临江, 梁庆祥. 肺结核患者肺灌洗液细胞分泌 γ 干扰素和白细胞介素-12 的变化[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2000, 23(9): 552 - 555.

[6] Torres M, Herrera T, Villareal H, *et al*. Cytokine profiles for peripheral blood lymphocytes from patients with active pulmonary tuberculosis and healthy household contacts in response to the 30-kilodalton antigen of Mycobacterium tuberculosis[J]. Infect Immun, 1998, 66(1): 176 - 180.

[7] Verbon A, Juffermans N, Van Deventer S J, *et al*. Serum concentrations of cytokines in patients with active tuberculosis (TB) and after treatment[J]. Clin Exp Immunol, 1999, 115(1): 110 - 113.

[8] Somoskovi A, Zissel G, Zipfel P F, *et al*. Different cytokine patterns correlate with the extension of disease in pulmonary tuberculosis[J]. Eur Cytokine Netw, 1999, 10(2): 135 - 142.

[9] 张 放, 侯显明. 添加卡介苗 RAW264 巨噬细胞释放细胞因子和一氧化氮的影响[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2002, 25(11): 699 - 700.

[10] Greinert U, Ernst M, Schlaak M, *et al*. Interleukin-12 as successful adjuvant in tuberculosis treatment[J]. Eur Respir J, 2001, 17(5): 1049 - 1051.

[11] Turner J, Gonzalez-Juarrero M, *et al*. *In vivo* IL-10 production reactivates chronic pulmonary tuberculosis in C57BL/6 mice[J]. J Immunol, 2002, 169(11): 6343 - 6351.

[12] 周向东, 兰 箭, 张 婷. 对结核性胸膜炎患者使用分支杆菌类免疫刺激剂的商榷性研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2002, 25(10): 595 - 597.

(编辑 陈聪连)

(上接 1758 页)

随着临床使用米非司酮的范围逐渐广泛,以往在宫外孕时禁止使用的情况,也随之得到改善。大量报道,单用米非司酮或者米非司酮与氨甲蝶呤合用于宫外孕的保守治疗,收到了较好的治疗效果[3,4]。我们在异位妊娠的治疗中,也在使用氨甲蝶呤的同时使用了米非司酮,效果较单用氨甲蝶呤好。既然宫内妊娠和宫外妊娠都可以使用米非司酮,差别只是在于宫内妊娠需要使用米索前列醇而宫外妊娠禁止使用米索前列醇,因此我们想到早早孕时,虽然不能够确定是宫内妊娠,但米非司酮的使用是可以的。并且由于 B 超没有看见宫内宫外有妊娠物,而血和尿的 HCG 测定阳性,说明胚胎发育很小,不论胚胎在哪里着床,此时单用米非司酮都可以达到终止妊娠的目的。

根据我们对米非司酮 150 mg 终止早早孕的 40 例观察,有效率为 97.5%。1 例无效可能与宫内双胎妊娠,所用的药物量不足有关。是否可以加大剂量,有待于进一步观察。对于异位妊娠时任意加大米非司酮剂量,我们观察到可以引起药物性肝炎。1 周后复查,已经有过流血量基本似往常月经量的情况,阴道流血已经干净或者基本干净。文献[5, 6]报道,采用米非司酮 150 mg 顿服配伍米索前列醇 400 μg 2 d 后阴道给药进行催经止孕,完全流产率达 92.6%,治疗效果较好。我们的观察结果表明,单用米非司酮终止早早孕,安全、简便、有效,值得临床推广应用。

关键词: 早孕;米非司酮

中图法分类号: R719.31 **文献标识码:** B

参考文献:

[1] 邱晓燕, 李大金, 周先荣, 等. 米非司酮抗早孕宫腔组织的病理学研究[J]. 中华妇产科杂志, 1999, 34(5): 272 - 274.

[2] 刘 凯, 李雪梅. 抗早孕剂量米非司酮配伍米索前列醇终止中孕的临床探讨[J]. 苏州医学院学报, 2000, 20(12): 1168 - 1169.

[3] 周建萍, 汤巧玲. 测定血清孕酮及 β - HCG 预测米非司酮治疗异位妊娠的疗效[J]. 湖南医学, 1999, 16(5): 345 - 346.

[4] 张国华. 米非司酮治疗异位妊娠的疗效观察[J]. 实用妇产科杂志, 1999, 15(1): 45 - 46.

[5] 肖碧莲, 吴尚纯. 米非司酮用于避孕的系列临床研究进展[J]. 中华妇产科杂志, 2003, 38(8): 499 - 501.

[6] Xiao B L, Von Hertzen H, Zhao H, *et al*. A randomized double-blind comparison of two single doses of mifepristone for emergency contraception [J]. Hum Reprod, 2002, 17(12): 3084 - 3089.

(编辑 薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net