DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.03.032

文章编号:1000-5404(2000)03-0281-03

临床研究

肺炎患者支气管肺泡洗液中激肽形成机制的探讨

彭 渤[1],钱桂生[2] ([1]空军总医院呼吸内科,北京 100036;[2]第三军医大学附属新桥医院全军呼吸内科研究所,重庆 400037)

提 要 目的:探讨下呼吸道急性炎症时激肽生成途径。方法:测定肺炎患者(肺炎组)和健康志愿者(对照组)支气管肺泡灌洗液(BALF)中激肽,激肽形成酶活性,血浆血管舒缓素(PK)和α_2-巨球蛋白(α_2-M),并鉴定激肽形成酶活性分子来源。结果:肺炎组BALF中的各种检测指标均明显高于对照组($P<0.001$);经凝胶过滤和酶抑制试验鉴定,肺炎患者BALF中主要激肽形成酶活性位于高分子量部分,PK抑制物能显著抑制此活性。结论:肺炎患者激肽和激肽形成活性明显升高,其激肽形成酶活性主要来自PK。

关键词 肺炎;激肽;血管舒缓素;α_2-巨球蛋白;BALF

中图法分类号 R563.102 文献标识码 A

Kinins generation pathway in bronchoalveolar lavage fluid from patients with pneumonia

PENG Bo, QIAN Gui-sheng (Department of Respiratory Diseases, General Hospital of PLA Airforce, Beijing 100036, China)

Abstract Objective: To investigate the kinins generation pathway in acute airway inflammation. Methods: The bronchoalveolar lavage fluid (BALF) from patients with pneumonia and healthy individuals was collected to determine kinins, plasma kallikrein, a_2-macroglobulin and kinins generation enzyme activity. Results: Kinins and kinins generation activity in the BALF were significantly higher in patients with pneumonia than in the controls ($P<0.001$). Gel filtration and enzyme activity inhibition test showed that the kinins generation activity in BALF from patients with pneumonia was inhibited by plasma kallikrein. Conclusion: Kinins and kinins generation activity in acute airway inflammation are significantly increased and kinins seems to be mainly generated by plasma kallikrein.

Key words pneumonia; kinins; plasma kallikrein; a_2-macroglobulin; BALF

激肽是重要的炎症介质,主要的激肽形成酶有PK和组织血管舒缓素(TK),PK存在于血浆,而TK由局部组织和腺体分泌。二者的分子量,免疫原性以及抑制物不同。已知变应性鼻炎时约75%的激肽生成活性来自于PK[1]。有关下呼吸道急、慢性炎症过程中激肽生成途径和机制未见报道。我们对肺炎患者和健康志愿者的支气管肺泡灌洗液进行分析,探讨呼吸道急性炎症时激肽生成机制。

1 材料与方法

1.1 病例

肺炎组:经X线,纤维支气管镜及病理活检确诊为肺炎患者12例,男7例,女5例,平均年龄68岁。8例健康志愿者作为对照组,男4例,女4例,平均年龄60岁。所有受试者均除外肝肾疾病,及其它免疫性或感染性疾病。

1.2 主要试剂

兔抗人PK和兔抗人α_2-M抗体及纯化人PK和α_2-M由Medor公司提供,山羊抗人血清白蛋白、山羊抗人缓激肽、人体缓激肽由Sigma公司提供,苯甲酰胺、大豆胰蛋白酶抑制剂(SBTI)、牛血清白蛋白(BSA)、人血清白蛋白(HSA)、抗生物素

作者简介:彭 渤(1956.3),女,河北省徐水市人,博士,副主任医师,主要从事呼吸道炎症疾病时血管舒缓素-激肽系统的研究,发表论文13篇。电话:(023)68716735

收稿日期:1999-07-07;修回日期:1999-10-25

?1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

链球亲合素-碱性磷酸酯、^{3}H-TAME 和^{125}I、生物素标记试剂盒由 Amersham 公司提供，聚丙烯酰胺-葡聚糖 S-300 凝胶、DEAE-葡聚糖凝胶 G-100 和凝胶层析柱由 Pharmacia 公司提供。

1.3 BALF 采集

BALF 是在纤支镜检查时获得。将 60 ml 灭菌生理盐水分 3 次注入患侧病变支气管肺泡，13.3 kPa(100 mmHg)负压吸引，将 EDTA(0.01 mol/L)加入 BALF，4 000 r/min 4℃离心 10 min，上清液置－70℃冰箱待用。

1.4 激肽和 TAME-ea 测定

激肽用 Baumgarten 等建立的放射免疫法，可测最低浓度为 40 ng/L。TAME-ea(甲苯二氧硫基精氨酸甲酯-酯酶活性)用 Baumgarten 等[1]建立的放射化学分析法测定。

1.5 检测 PK 和 α_2-M 的 ELISA 方法

在本研究中我们建立了测定 PK 和 α_2-M 的 ELISA 方法。分别用浓度为 2 mg/L 的兔抗 PK 或兔抗 α_2-M 抗体 100 μl/孔包被酶标板。纯化 PK 或 α_2-M 作为标准，生物素标记 PK 或 α_2-M 抗体作为检测抗体。其测定最低浓度分别为 20 μg/L 和 40 μg/L。

1.6 凝胶过滤层析

同 Baumgarten 等[1]所述方法。

1.7 TAME-ea 抑制试验

将最终浓度分别为 10^{-5} mol/L 苯甲酰胺、10^{-5} mol/L SBTI 和 2×10^{-5} mol/L 抑肽酶等抑制物加入 TAME-ea 峰值的各管液中，培养 30 min 后测定 TAME-ea。

1.8 统计学处理

文章和图表中的数字如无特殊说明均采用 $\bar{x}\pm s$。整个统计工作均采用 STATGRAPHICS 软件程序。用 Wilcoxon 设计的 u 检验进行不同组间的比较。

2 结果

2.1 BALF 测定结果

肺炎组患者 BALF 中激肽，PK，α_2-M，TAME-ea 测定值均明显高于对照组，见表 1。

表 1 BALF 检测结果

Tab 1 Results in BALF

Group	n	TAME-ea (min^{-1})	PK (ρ_B/μg·L^{-1})	α_2-M (ρ_B/mg·L^{-1})	Kinins (ρ_B/ng·L^{-1})
Pneumonia	12	12 456 ± 1 294	492 ± 117	312 ± 48	950 ± 415
Control	8	1 232 ± 245	18 ± 5	82 ± 30	< 40
P		< 0.001	< 0.0001	< 0.001	< 0.001

2.2 BALF 凝胶过滤后结果

肺炎组患者 BALF 经凝胶过滤后，其 TAME-ea 最高峰位于～800 000(峰Ⅰ)，与第一个 α_2-M 高峰重叠(～800 000)。100 000～400 000(峰Ⅱ)以及 60 000～25 000(峰Ⅲ)的 TAME-ea 峰都低。PK 免疫反应峰在约 100 000 分子量部分。对照组的 BALF 凝胶过滤后未能测到任何曲线，见图 1。

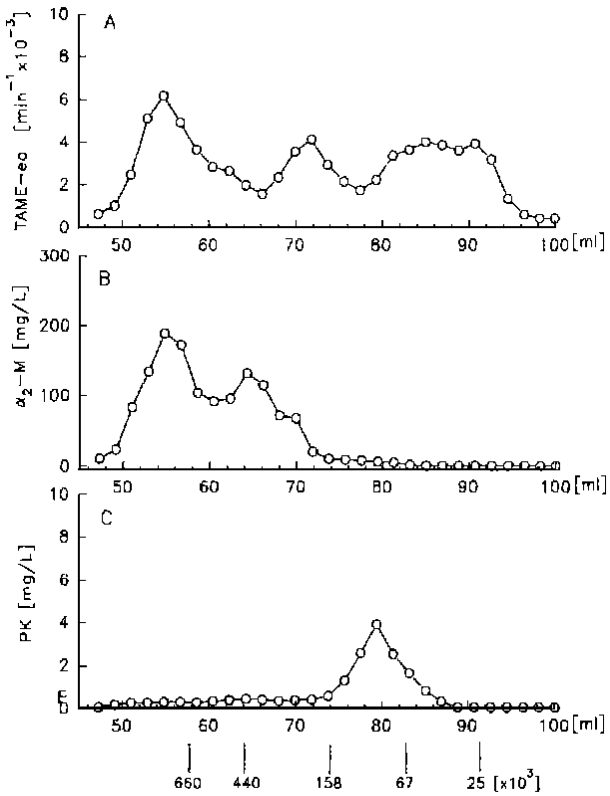


图 1 肺炎组患者凝胶过滤后 TAME-ea(A)，α_2-M(B)，PK(C)测定结果

Fig 1 TAME-ea(A)，α_2-M(B)，PK(C) in BALF after gel filtration in pneumonic patients

2.3 TAME-ea 抑制试验

TAME-ea 峰Ⅰ不能被 SBTI 抑制，但能被苯甲酰胺明显抑制(93%)，峰Ⅲ被抑肽酶部分抑制(64%)，见表 2。

表 2 肺炎组 BALF 凝胶过滤后 TAME-ea 抑制试验结果

Fig 2 Results of TAME-ea activity inhibition test after gel filtration in pneumonic group

	Inhibition(%)		
	Peak Ⅰ > 600 000*	Peak Ⅱ 200 000～500 000	Peak Ⅲ 24 000～60 000
Aprotinin(2×10^{-5} mol/L)	33 ± 8	39 ± 18	64 ± 13
Benzoic amide(2×10^{-3} mol/L)	93 ± 5	42 ± 17	26 ± 11
SBTI(2×10^{-5} mol/L)	14 ± 5	24 ± 16	27 ± 10

* : Molecular weight at peak

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

2.4　相关分析

将可测到激肽值的 BALF 用以进行相关分析。激肽水平与 TAME-ea(r=0.48, P<0.05, n=12)明显相关, 与 α_2-M(r=0.60, P<0.001, n=12), PK(r=0.51, P<0.01, n=12)显著相关, α_2-M 与 PK 相关性尤其显著(r=0.92, P<0.0001, n=12)。

3　讨论

缓激肽(Bradykinin)以及内源性相关肽 Lys-bradykinin、Met-Lys-bradykinin 统称为激肽(Kinins)。激肽具有降低血压、收缩支气管平滑肌、增加血管通透性、引起疼痛和痛觉敏感、促进第二代炎症介质合成释放等多种生物活性。速激肽是由呼吸道的 C-感觉神经纤维分泌, 导致神经源性炎症。有人推测, 激肽的某些作用如支气管作用可能是由速激肽介导的[1,2]。大量资料表明, 激肽在许多急、慢性炎症疾病的发生发展中起着重要作用[3,4]。抑制激肽的生成能抑制和减轻病情发展[4,5], 因此探讨激肽的不同生成途径具有重要意义。

α_2-M 既作为血浆渗透的标志, 又是 PK 的一种主要抑制物[6]。当其与 PK 结合后, 通过空间占位阻碍激肽原与 PK 酶活性中心结合。此时酶活性中心并未被破坏, 仍能分解一些小分子底物如 TAME, 即 TAME-酯酶活性(TAME-ea)[7], 因此人们用体液中的 TAME-

ea 作为激肽生成活性的间接标志。合成物苯甲酰胺和 SBT1 是 PK 的有力抑制物。但当 PK 与 α_2-M 结合后, PK 的 TAME-ea 只被小分子物苯甲酰胺(157)抑制, 却不被 SBT1(20 000)抑制, 这是因为后者分子大, 不能与复合物酶活性中心接触。在体内, TK 主要被 TK 结合蛋白(KBP)和 α1-抗胰蛋白酶抑制[8]。而抑肽酶是 TK 在体外的有力抑制物。

本研究结果表明, 在呼吸道急性炎症时, 激肽生成明显增强。对凝胶过滤后 BALF 分析显示, 肺炎组 TAME-ea 高峰恰与该处的高 α_2-M 高峰重叠; 相关分析显示激肽与 PK 及 α_2-M 呈高度相关性。表明肺炎组时大量 PK 和 α_2-M 渗出至支气管肺组织, 激活的 PK 与 α_2-M 形成复合物, 峰Ⅰ中 TAME-ea 是由复合物中的 PK 产生。TAME-ea 活性抑制试验也证实了这一点。因此我们至少可以认为, 在呼吸道急性炎症时激肽生成增强。激肽形成活性主要来源于血浆渗出的 PK。

参考文献

[1] Baumgarten C R, Nichols R C, Naclerio R M, *et al*. Plasma kallikrein during experimentally-induced allergic rhinitis: Role in kinins formation and contribution to TAME-esterase activity in nasal secretions[J]. J Immunol, 1986, 137(3): 977－982.

[2] Ricciardolo F L M, Nadel J A, Graf P D, *et al*. Role of kinins in anaphylactic-induced bronchoconstriction mediated by tachykinins in guinea-pigs[J]. Br J Pharmacol, 1994, 113(2): 508－512.

[3] Proud D, Kaplan A P. Kinins formation: Mechanisms and role in inflammation disorders[J]. Annu Rev Immunol, 1988, 6(1): 49－83.

[4] Yavovaya G, Shutov E, Jebellenko G, *et al*. Molecular and functional aspects of alterations in the kallikrein-kinins-system activity in human blood plasma at different stages of peritonitis and chronic renal failure [J]. Immunopharmacology, 1996, 32(1－3): 135－140.

[5] Stadnicki A, Dela cadena R A, Sartor R B, *et al*. Selective plasma kallikrein inhibitor attenuates acute intestinal inflammation in lewis rat[J]. Dig Dis Sci, 1996, 41(5): 912－920.

[6] Uchiba M, Okajima K, Murakami K, *et al*. Effects of plasma kallikrein specific inhibitor and active-site blocked factor Vlla on the pulmonary vascular injury induced by endoxin in rats[J]. Thromb Haemost, 1997, 78(4): 1 209－1 214.

[7] Suzuki M, Ito A, Mori Y, *et al*. Kallikrein in synovial fluid with rheumatoid arthritis[J]. Biochem Med Metab Biol, 1987, 37(2): 177－183.

[8] Chao J, Chai K X, Chen L M, *et al*. Tissue kallikrein-binding protein is a serpin I: Purification, characterization, and distribution in normotensive and spontaneously hypertensive rats[J]. J Biol Chem, 1990, 265(27): 16 394－16 401.

(编辑　王　红)

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