DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.03.036

技术方法

文章编号:1000-5404(2000)03-0292-02

雾化吸入γ-干扰素增强免疫低下大鼠肺部抗白色念珠菌感染能力

Experimental study of IFN-γvia aeroso enhancing the anti-infection ability of the lungs in immunocompromised rats

马 壮,钱桂生,黄桂君,毛宝龄 (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:研究雾化吸入γ-干扰素对免疫低下大鼠肺部抗感染能力的增强作用。方法:醋酸考的松皮下注射复制大鼠免疫低下模型,检测气管内注射白色念珠菌或气管内注射白色念珠菌并雾化吸入γ-干扰素1、3、7 d的免疫低下大鼠肺泡巨噬细胞的吞噬及杀菌功能,抗原提呈功能,以及培养上清中TNF-α活性,并于第7天进行左肺白色念珠菌培养计数。结果:雾化吸入γ-干扰素组大鼠肺泡白色念珠菌计数显著少于免疫低下组大鼠($P<0.05$)。雾化吸入γ-干扰素组大鼠肺泡巨噬细胞的吞噬及杀菌百分率显著高于免疫低下组大鼠($P<0.01$)。雾化吸入γ-干扰素组大鼠肺泡巨噬细胞Ia抗原表达的阳性率显著高于免疫低下组大鼠($P<0.01$)。雾化吸入γ-干扰素组大鼠肺泡巨噬细胞培养上清中TNF-α的活性显著高于免疫低下组大鼠($P<0.05$)。结论:雾化吸入γ-干扰素可明显增强免疫低下大鼠肺部抗白色念珠菌感染能力。

随着器官移植、肿瘤化疗、以及多种疾病免疫治疗的普遍开展,免疫抑制药物的使用,免疫低下患者日益增多。由此造成的难治性呼吸系统感染已经成为这些患者的主要死亡原因。目前认为免疫低下宿主肺部细胞免疫功能低下主要是因为缺乏淋巴细胞源性细胞因子。本研究探讨通过雾化吸入的方法补充肺局部γ-干扰素水平,从而增强免疫低下大鼠抵抗白色念珠菌肺部感染能力的可行性。

1 材料和方法

1.1 动物模型的制备和分组

给雄性Wistar大鼠(150~180 g)隔日1次皮下注射醋酸考的松100 mg/kg,14 d后制成免疫低下大鼠模型。并于第14天气管内注射白色念珠菌菌液0.2 ml(左右侧各0.1 ml,1×10^6 cfu/ml,本校微生物教研室馈赠),制成免疫低下并有白色念珠菌支气管-肺感染的大鼠模型。将大鼠随机地分为免疫低下+白色念珠菌1、3、7 d组和免疫低下+白色念珠菌+干扰素1、3、7 d组,每组5只。

1.2 给γ-干扰素方法

免疫低下+白色念珠菌+干扰素1、3、7 d组大鼠于气管内注射白色念珠菌的前1 d开始,雾化吸入γ-干扰素(购于PEPRO TECH INC.)10 000 IU,每日1次,至实验结束。雾化器为PLA933-Ⅰ型雾化治疗器,雾化率0.25 ml/min,雾化颗粒直径(6.294±1.333)μm。

1.3 标本留取

大鼠经戊苯巴比妥麻醉后分离颈部气管,穿刺置入套管,用Hanks液进行支气管肺泡灌洗,每次10 ml,共5次,留取支气管肺泡灌洗液(BALF)。分离肺泡巨噬细胞用于以下检测。

1.4 肺泡巨噬细胞的吞噬及杀菌功能检测

白色念珠菌法[1]。

1.5 肺泡巨噬细胞Ia抗原的表达

将分离获得的肺泡巨噬细胞用含10%小牛血清的RPMI-1640调整浓度为1×10^6/ml,取50 μl于洁净载玻片上,5%CO_2、37°C贴壁2 h。预温37°C Hanks液洗涤6次。2%多聚甲醛固定。37°C Hanks液洗涤6次。加小鼠抗大鼠Ia抗体50 μl(PharMingen),37°C 1 h。37°C Hanks液洗涤3次。加FITC标记的山羊抗小鼠IgG抗体50 μl(Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.),37°C 1 h。用预温37°C Hanks液洗涤3次。封片。荧光显微镜下计数Ia抗原阳性的肺泡巨噬细胞的阳性率[2]。

1.6 肺泡巨噬细胞培养上清中TNF-α的活性测定

取0.5 ml(1×10^6/ml)含10%小牛血清的RPMI-1640悬液加入24孔细胞培养板,5%CO_2、37°C贴壁2 h。用预温37°C Hanks液洗涤6次。加入含10%小牛血清的PRMI-1640 1 ml,5%CO_2、37°C培养36 h。采用L929细胞毒性试验测定上清中TNF-α的活性[3]。

1.7 肺组织白色念珠菌培养

将气管内注射白色念珠菌7 d组的大鼠的左肺取下,无菌条件下剪碎,置入培养管,加白色念珠菌培养液5 ml,及各200 u/ml的青、链霉素,37°C摇床摇动培养24 h,计数白色念珠菌。

1.8 统计学处理

采用t检验。

2 结果

2.1 雾化吸入γ-干扰素的白色念珠菌清除作用

气管内注射白色念珠菌7 d后,左肺白色念珠菌培养24 h,

基金项目:第三军医大学校管科研课题

作者简介:马 壮(1964.12),男,辽宁省沈阳市人,博士后,副主任医师,主要从事肺部感染方面的研究,发表论文8篇,现在沈阳军区总医院。电话:(023)68755320

收稿日期:2000-01-07;修回日期:2000-03-03

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

免疫低下组大鼠白色念珠菌总数为 $10^8 \sim 10^9$ 数量级, 仅 1 例为 4.79×10^7。吸入γ-干扰素组大鼠白色念珠菌总数为 $10^6 \sim 10^7$ 数量级, 且有 1 例未生长白色念珠菌, 见表 1。经 t 检验分析, 两组差异显著($P<0.05$)。

表 1　雾化吸入 γ-干扰素对肺部白色念珠菌清除的作用

	白色念珠菌计数(cfu/左肺)		P
	免疫低下组	吸入 γ-干扰素组	
	5.10×10^8	4.56×10^7	
	4.98×10^7	7.67×10^6	
	1.22×10^9	2.16×10^7	
	6.84×10^8	1.80×10^6	
	6.50×10^8	0	
$x\pm s$	$(6.22\pm 4.17)\times 10^8$	$(1.53\pm 1.89)\times 10^7$	<0.05

2.2　雾化吸入 γ-干扰素对肺泡巨噬细胞吞噬功能的影响

免疫低下组大鼠气管内注射白色念珠菌后 1、3、7 d, 肺泡巨噬细胞吞噬白色念珠菌的百分率分别为(62.8±4.44)%、(69.0±3.54)%、(72.0±2.70)%。吸入γ-干扰素组大鼠肺泡巨噬细胞吞噬白色念珠菌的百分率分别为(89.6±2.30)%、(91.0±3.16)%、(92.6±2.07)%。经 t 检验分析, 相应天数两组的肺泡巨噬细胞吞噬白色念珠菌百分率差异均显著($P<0.01$)。

2.3　雾化吸入 γ-干扰素对肺泡巨噬细胞杀菌功能的影响

免疫低下组大鼠气管内注射白色念珠菌后 1、3、7 d, 肺泡巨噬细胞杀死白色念珠菌的百分率分别为(45.4±4.67)%、(50.2±1.92)%、(54.2±2.77)%。吸入γ-干扰素组大鼠肺泡巨噬细胞杀死白色念珠菌的百分率分别为(60.4±1.14)%、(68.2±4.82)%、(70.0±1.58)%。经 t 检验分析, 相应天数二组的肺泡巨噬细胞杀死白色念珠菌百分率差异均显著($P<0.01$)。

2.4　雾化吸入 γ-干扰素对肺泡巨噬细胞 Ia 抗原表达的影响

免疫低下组大鼠气管内注射白色念珠菌后 1、3、7 d, 肺泡巨噬细胞 Ia 抗原表达阳性率分别为(35.4±3.85)%、(39.6±2.97)%、(46.4±2.97)%。吸入γ-干扰素组大鼠肺泡巨噬细胞 Ia 抗原表达阳性率分别为(51.4±2.07)%、(63.4±3.44)%、(66.6±3.97)%。经 t 检验分析, 相应天数二组的肺泡巨噬细胞 Ia 抗原表达阳性率差异均显著($P<0.01$)。

2.5　雾化吸入 γ-干扰素对肺泡巨噬细胞分泌 TNF-α 的刺激作用

免疫低下组大鼠和吸入γ-干扰素组大鼠气管内注射白色念珠菌后 1、3、7 d, 肺泡巨噬细胞培养上清中 TNF-α 的活性见表 2。经 t 检验分析, 相应天数二组的肺泡巨噬细胞培养上清中 TNF-α 的活性差异均显著。

表 2　肺泡巨噬细胞培养上清中 TNF-α 活性

		免疫低下组	吸入 γ-干扰素组	P
TNF-α 活性(IU/ml)	1 d	472±45.8	651±107.0	<0.05
	3 d	490±43.6	1250±295.2	<0.01
	7 d	1057±270.1	1537±244.8	<0.05

3　讨论

细胞因子作为调节机体免疫状态的活性物质, 具有仅需小剂量、局部发挥作用等特点。有实验表明γ-干扰素有明显增强机体细胞免疫功能的作用。雾化吸入(或气管内注射)γ-干扰素可增强肺泡内巨噬细胞和中性粒细胞的吞噬及杀菌功能, 肺泡巨噬细胞的抗原提呈功能, 增加对某些(特别是机会致病)病原体的清除[4~5]。同时还可通过细胞因子网络系统使 TNF-α 等细胞因子的肺内水平升高, 从而产生协同作用。我们的实验表明雾化吸入γ-干扰素可明显提高免疫低下大鼠肺泡巨噬细胞的吞噬和杀菌功能; 增加肺泡巨噬细胞 Ia 抗原的表达, 使肺泡巨噬细胞的抗原提呈功能得以加强; 并通过细胞因子网络刺激肺泡巨噬细胞分泌 TNF-α, 使 TNF-α 的活性增加。从而显著增加免疫低下大鼠肺部清除白色念珠菌的能力, 二组的白色念珠菌计数相差达 10~100 倍/左肺。说明雾化吸入γ-干扰素可明显增强免疫低下宿主肺部抗白色念珠菌感染能力。

关键词　雾化吸入; γ-干扰素; 免疫低下; 大鼠
中图法分类号　R593.3　　文献标识码　B

参考文献

[1] 武建国. 非特异免疫功能测定[A]. 见: 武建国主编. 实用临床免疫学检验[M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1989. 136—137.

[2] Skerrett S J, Martin T R. Alveolar macrophage activation in experimental legionellosis[J]. J Immunol, 1991, 147(2): 337—345.

[3] Skerrett S J, Martin T R. Roles for Tumor Necrosis factor alpha and nitric oxide in resistance of rat alveolar macrophages to legionella pneumophila[J]. Infect Immun, 1996, 64(8): 3 236—3 243.

[4] Condos R, Rom W N, Schluger N W. Treatment of multidrug-resistant pulmonary tuberculosis with interferon-γ via aerosol[J]. The Lancet, 1997, 349(9064): 1 513—1 515.

[5] Yap G S, Sher A. Effector cells of both nonhemopoietic and hemopoietic origin are required for interferon (IFN)-gamma- and tumor necrosis factor (TNF)-alpha-dependent host resistance to the intracellular pathogen, Toxoplasma gondii[J]. J Exp Med, 1999, 189(7): 1 083—1 092.

(编辑　郭建秀)

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