DOI:10.16016/j.1000-5404.1996.02.019

吸入嗜酸性粒细胞成分溶液对豚鼠气道反应性的影响

王长征 郭先健 王顺朝 (第三军医大学附属新桥医院呼吸内科研究所) 重庆,630037

提 要 从多粘菌素B处理的豚鼠腹腔渗出液中,分离嗜酸性粒细胞(Eos)用超声粉碎仪破坏细胞,离心后收集含Eos成分的上清液,给豚鼠经气管插管雾化喷入。60 min后豚鼠对组胺的气道反应性PC_{20}值显著降低($P<0.05$)。Eos成分吸入处理组和正常对照组支气管肺泡灌洗液(BALF)中的细胞总数、Eos绝对计数差异均无显著意义($P>0.05$)。但BALF细胞中上皮细胞的百分比显著增多($P<0.001$),并且与60 min时PC_{20}值的降低呈显著正相关($r=0.84$, $P<0.05$)。以上结果提示Eos可能通过其细胞成分造成气道上皮损伤诱导气道高反应性。

关键词 嗜酸性粒细胞;上皮/气道;气道高反应性
中图法分类号 R562.2502

嗜酸性粒细胞(Eos)作为哮喘气道炎症的关键效应细胞在气道高反应性(BHR)的形成中起重要作用,Eos的颗粒蛋白具有细胞毒性,在体外实验中能明显地造成气道上皮细胞损伤[1]。气道上皮损伤能否造成气道高的反应性尚有争议[2,3]。本研究观察了给豚鼠直接吸入Eos成分溶液对气道反应性的影响以及与气道上皮细胞脱落的关系。

1 材料与方法

1.1 动物分组

健康豚鼠12只,重量400～500 g、雌雄不拘,随机分为两组。

1.1.1 Eos组($n=6$) 将Eos成分溶液4 ml,加入超声雾化器雾化5 min(0.8 ml/min),经气管插管喷入豚鼠呼吸道。分别在处理前和处理后第30、15、60 min测定对组胺的气道反应性。测定气道反应性完毕,行支气管肺泡灌洗操作。

1.1.2 对照组($n=6$) 用生理盐水代替Eos成分溶液,按Eos组的方法进行。

1.2 实验方法

1.2.1 制备Eos成分溶液 从经多粘菌素B处理豚鼠腹腔渗出液中,分离提取Eos[4]。用生理盐水调细胞数为3×10^6/ml,用超声粉碎仪(CPS-1A型上海超声波仪器厂)破坏细胞。1800 g离心10 min,收集含Eos颗粒蛋白的上清液[5]备用。

1.2.2 测定气道反应性 按文献[6]的方法测定。

1.2.3 支气管肺泡灌洗(BAL) 经颈总动脉放血,然后处死动物,立即用冰冷Hank's液5 ml×2次进行灌洗。需BALF回收率>50%方可用于细胞计数、Eos绝对计数和Wright染色细胞分类。分类时上皮细胞单独计数,至少计数200个细胞中的上皮细胞。

2 结果

2.1 气道反应性改变

正常豚鼠吸入Eos成分溶液后PC_{20}值逐渐减少。60 min时较处理前PC_{20}值显著降低($P<0.05$)。对照组则无显著变化($P>0.05$)。结果见图1。

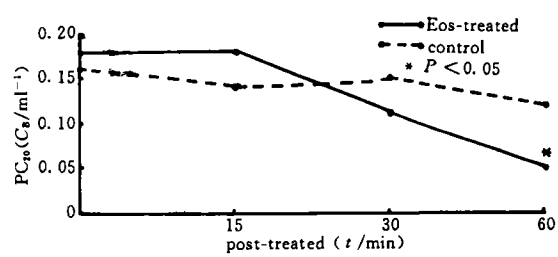


图1 吸入嗜酸性粒细胞成分溶液后的气道反应性改变

Fig 1 Changes of airway resposiveness after inhalation of the solution of eosinophil components by guinea pigs

2.2 BALF细胞学改变

Eos处理组和对照组比较,BALF细胞总数、Eos绝对计数及分类差异均无显著性($P>0.05$)。但BALF细胞分类中上皮细胞的百分比显著增多($P<0.001$)。结果见附表。

附表 BALF细胞学比较($\bar{x}\pm s$)

Table The profile of cells in BALF($\bar{x}\pm s$)

Group	Total cells (10^6)	Eos counts(10^5)	Catoluge of cells (%)				Epi (%)
			Eos	AM	Neu	Lym	
Eos($n=6$)	4.78±0.37	3.37±1.98	6.3±2.20	87.0±2.1	2.0±1.9	4.6±0.7	16.4±4.0☆
Control($n=6$)	4.09±1.10	2.78±1.42	5.4±1.90	87.9±1.9	1.4±0.5	5.3±0.7	2.5±0.8

AM: alveolar macrophages, Eos: eosinophils, Neu: neutrophils, Lym: lymocytes, Epi: epitbelial cells EG: eosinophil-treated group, CG: control group. ☆: $P<0.001$ *vs* control group

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

2.3 上皮细胞与气道反应性的关系

Eos 处理组在60 min 时，BALF 中上皮细胞百分比与气道反应性 PC_{20} 值减小的百分比呈显著正相关（$r=0.84$，$P<0.05$）。结果见图2（用美国哈佛大学制图软件）。

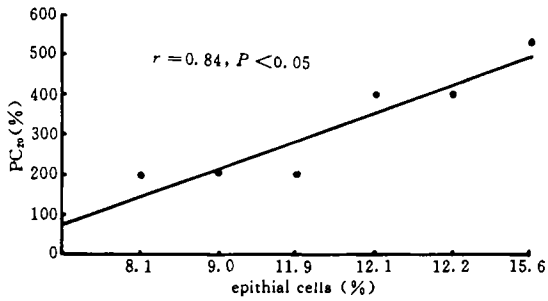


图2 上皮细胞与气道反应性的相关性

Fig 2 The association of percentage of declined PC_{20} values and epithial cells in BAL fluid

3 讨论

BHR 是哮喘的重要病理生理特征及发病基础，其形成机理尚不完全清楚。哮喘患者有明显的 Eos 增多，而且哮喘患者外周血和 BALF 中的 Eos 数量均与 BHR 关系密切。在动物实验中，给灵长目哮喘动物模型的气管中滴入主要碱性蛋白（MBP），可产生 BHR[7]。用机械方法剥除动物气道上皮可使气道反应性升高。哮喘患者 BALF 中的 MBP 浓度、上皮细胞数与气道反应性显著相关[8]。这些资料提示 Eos 与上皮损伤、BHR 关系密切。本文直接给实验豚鼠吸入 Eos 成分溶液60 min 后，气道反应性显著升高，表明 Eos 确实能诱导 BHR。

哮喘患者有明显的支气管粘膜上皮脱屑，纤毛细胞损伤等改变。Eos 颗粒中的碱性蛋白具有极强的细胞毒性，是 Eos 对哮喘气道上皮损伤的关键因素。哮喘患者和正常人气道上皮的完整性与气道反应性呈显著相关[9]。在犬、豚鼠、猪的实验中均发现气道上皮损伤可诱导 BHR。但也有人发现豚鼠气道上皮剥除不产生 BHR[3]。气道上皮损伤造成 BHR 的机理尚未完全阐明。其机理可能有：上皮来源的松弛因子减少；上皮的通透屏障破坏等。本文中，由于吸入 Eos 成分溶液诱导的 BHR 出现较缓慢，故不太可能是 Eos 及脂类炎性产物直接作用支气管平滑肌收缩的结果。吸入 Eos 成分溶液60 min 后，BALF 中上皮细胞显著增多，并且与 PC_{20} 值下降显著相关，提示 Eos 可能通过损伤气道上皮诱导 BHR。本文按提取 Eos 颗粒蛋白的方法，粉碎细胞，收集含颗粒蛋白的上清给豚鼠吸入。所以，Eos 处理组 BALF 中上皮细胞增多可能是 Eos 颗粒蛋白作用的结果。探讨 Eos 诱导 BHR 的作用机理可为临床防治哮喘提供理论基础。

参考文献

1 王长征. 嗜酸性粒细胞与哮喘气道上皮损伤（综述）. 国外医学：病理生理学与临床分册，1993；13(3)：120

2 Nijkamp FP, Van der Linde HJ, Fdkerts G. Nitric oxide synthnesis inhibitors induce airway hyperresponsiveness in the guinea pig in vivo and in vitro: Role of the epithelium. Am Rev Respir Dis，1993；148：727

3 Strk ME, White SR, Ndukwn IM *et al*. Physiologic significance of epithelial removal on guinea pig tracheal smooth muscle reponse to acetylcholine and serotonin. Am Rev Respir Dis，1993；148：1477

4 王长征，王顺朝，郭先健. 哮喘患者血清嗜酸性粒细胞趋化活性测定. 上海免疫学杂志，1993；13(6)：349

5 Ackerman SJ, Loegering DA, Venge P *et al* Distinctivr cationic proteine of the human eosinophils granule: major basic protein, eosinophil cationic protien, and eosinphil-derived neurotoxin. J Immunol，1983；131：2977

6 王长征，王顺朝，郭先健. 豚鼠哮喘模型的气道反应性测定. 第三军医大学学报1994；16(4)：277

7 Gundel RH, Barker RL, Hamann KJ *et al*. Polyglutamic acid inhibits eosinophil MBP-induced airway constriction and byperresonsiveness in primates. J Allergy Clin Immunol，1992；89：163

8 Wardlaw AJ, Dunnette S, Gleich GJ *et al*. Eosinophils and mast cells in bronchoalveolas lavage and mild asthma: relationship to bronchial hyperactivity. Am Rev Respir Dis，1988；137：1020

9 Jeffery PK, Waslaw AJ, Nelson FC *et al*. Bronchial biopsies asthma: an ultrastructural study and correlation with hyperractivity. Am Rev Respir Dis，1989；140：1745

（收稿：1995-12-24；修回：1996-03-29）

（编辑 张大春）

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

Effects of eosinophil component inhalation on respiratory responsiveness in guinea-pigs

Wang Changzheng, Guo Xianjian, Wang Shunchao (Clinical Center of Respiratory Disease, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract Eosinophils were collected from the peritoneal exudates of guinea-pigs pretreated with polymyxin B and the solution containing the protein of eosinophilic granules was prepared. After aerosolization, the solution was inhaled by guinea-pigs. It was found that the PC_{20} value was significantly decreased 60 minutes after inhalation ($P<0.01$). No obvious change of total cell count and eosinophil count but marked increase of epithelial cells in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were found after inhalation. In addition, the increase of epithelial cells in BALF was correlated to the decrease of PC_{20}. On the basis of these findings, it is concluded that eosinophils can induce hyperresponsiveness of the respiratory tract through the injury of its epithelium.

Key words eosinophil; epithelium/respiratory; hyperresponsiveness; guinea-pigs

（上接 121 页）

4/38(10.5%)，两组对比 $P>0.05$，差异无统计学意义。30/45(66.7%)例死亡病例都在疗后一年内死于远处转移。

3　讨论

3.1　生活质量与症状改善

晚期肺癌合并肺不张的治疗，Kohek[1]、Macha[2]报道用Nd-YAG激光结合高剂量率内照射支气管阻塞性肺癌，60%～70%的病人症状明显改善。本文先内照射组治疗后77%的病人症状明显改善，病人都能耐受治疗，而单纯外照射组疗毕60.5%的病人症状明显改善，有2例病情恶化不能坚持外照射，所以先内照射组比单纯外照射组有治疗次数少，反应轻，能耐受，症状改善快的优点。作者认为对于晚期肺癌合并肺不张的治疗可考虑首选腔内放疗，较迅速改善病人症状，提高了病人的生存质量，有利于下一步治疗。

3.2　肺复张与肺不张的时间和治疗方式的关系

先内照射组与单纯外照射组治疗后肺完全复张与部分复张分别为92%和63%，且肺不张的时间均在1/2～3月。疗后肺未能复张的病例先内照射组仅8%，其肺不张的时间超过半年；单纯外照射组有37%，其肺不张的时间在2～7月。两组对比，$P<0.05$，差异有统计学意义。由此说明肺复张与治疗方式有关，与肺不张时间的长短有一定关系，超过半年者复张困难。先内照射组对于肺复张优于单纯外照射，是由于内照射局部剂量高，癌组织变性、坏死、萎缩快，较迅速解除梗阻，使肺尽快复张。而单纯外照射组肿瘤局部剂量低，解除梗阻较慢，延长了肺不张的时间。

3.3　生存率

Cotter[3]报道对65例不能手术的支气管阻塞性肺癌，用内照射加外照射进行治疗，1年生存率为38%，2年生存率为23%。本文结果与国外文献报道相似。先内照射组与单纯外照射组1年生存率分别为38.5%和39.5%，2年生存率分别为15.4%和10.5%。两组1年，2年生存率无明显差异，由此说明晚期肺癌合并肺不张治疗后生存率与肺不张时间长短、治疗方式、肺复张可能无明显关系，造成此结果的原因系本文全部病例为晚期，有3例疗前已有远处转移，还有2例是外照射后复发引起，另有2例未坚持完成外照射，只能进行姑息性治疗有关。66.7%的病人疗后一年内死于远处转移，所以放疗肺叶复张后，远处转移是一个急待解决的问题，放疗前、中、后配合化疗，免疫治疗等综合治疗，可能会提高生存率，有待进一步分组研究。

关键词　肺不张；放射疗法

中图法分类号　R563.4

参考文献

1 Kohek P, Pakisch ZB, Rehak P *et al*. Nd-YAG laser debalking combined with Ir-192 HDR brachytherapy for obstructing cancer of the central bronchial airways: technique and results. Activity, 1990; 1(suppl): 45

2 Macha HN, Koch K, Wahlers B *et al*. Endoliumincal irradiation in obstructing bronchial tumors. Activity, 1990; 1 (suppl): 38

3 Cotter GW, Lariscy C, Ellingwood KE *et al*. Inoperable endobronchial obstructing lung cancer treated with combined endobronchial and external beam irradiation: a dosimetric analysis. international journal of radiation oncology. Biology Physics, 1993; 27(3): 531

（收稿：1995-05-06；修回：1995-12-22）

（编辑　冯崇英）

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