

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.01122

• 研究快报 •

肺泡表面活性物质对肺挫伤后肺泡巨噬细胞功能的影响

刘军强¹, 卢建², 潘铁文¹, 徐志飞^{1*}

1. 第二军医大学长征医院胸心外科, 上海 200003

2. 第二军医大学基础部病理生理学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的** 观察研究外源性猪肺表面活性物质(PPS)对肺挫伤大鼠肺泡巨噬细胞(AM)的吞噬功能和分泌功能的影响,探讨补充PPS对肺挫伤大鼠的治疗作用及其机制。**方法** 采用贴壁培养的方法,分离肺挫伤大鼠肺泡灌洗液中的AM,将分离的AM于普通培养液、含PPS(100 μg/ml或200 μg/ml)的培养液、含LPS(20 μg/ml)的培养液或含LPS(20 μg/ml)+PPS(100 μg/ml或200 μg/ml)的培养液中培养2 h后,采用真菌吞噬法测定各组细胞的吞噬功能;采用RT-PCR方法测定各组细胞中TNF-α mRNA含量。**结果** 与对照相比,PPS单独作用对AM的吞噬功能和TNF-α mRNA含量无明显影响。经LPS刺激后AM的吞噬功能增强,TNF-α mRNA含量明显增高。PPS对LPS导致的吞噬功能增强无明显作用,但是能明显降低TNF-α mRNA含量。**结论** PPS对AM的吞噬功能影响不大,但可以抑制TNF-α mRNA表达。

[关键词] 肺挫伤;巨噬细胞;肺表面活性物质;肿瘤坏死因子α**[中图分类号]** R 655.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)10-1122-03

Effects of pulmonary surfactant on alveolar macrophage function after pulmonary contusion

LIU Jun-qiang¹, LU Jian², PAN Tie-wen¹, XU Zhi-fei^{1*}

1. Department of Cardiothoracic Surgery, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

2. Department of Pathophysiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To observe the effects of porcine pulmonary surfactant(PPS) on the function of pulmonary alveolar macrophages(AMs) *in vitro*, so as to explore the mechanism by which PPS treating pulmonary contusion in rats. **Methods** AMs were separated by adherent culture from bronchoalveolar lavage fluid of rats with pulmonary contusion. The AMs were then cultured with media containing PPS (100 μg/ml or 200 μg/ml), LPS (20 μg/ml)+PPS (100 μg/ml or 200 μg/ml), or LPS (20 μg/ml) alone for 2 h. Then the phagocytic function of AMs in each group was examined with fungus. TNF-α mRNA was determined by RT-PCR in AMs of each group. AMs untreated with PPS and LPS were taken as blank control. **Results** The phagocytic function of the AMs and the expression of TNF-α mRNA were not significantly affected by PPS alone compared with the control group. LPS stimulation increased the phagocytic function of AMs and the TNF-α mRNA expression in AMs. PPS showed no significant effect on LPS-induced increase of phagocytic function of AMs, but it could greatly inhibit LPS-induced TNF-α mRNA increase. **Conclusion** PPS has no noticeable effect on the phagocytic function of the AMs, but it can inhibit TNF-α mRNA expression induced by LPS in AMs.

[Key words] pulmonary contusion; alveolar macrophage; pulmonary surfactant; tumor necrosis factor alpha

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(10):1122-1124]

肺挫伤后肺部的炎症反应是造成肺挫伤病情进一步发展的主要原因,在这一过程中肺泡巨噬细胞(alveolar macrophage, AM)发挥着重要作用。我们的前期研究发现,在肺挫伤早期经气道补充外源性猪肺表面活性物质(porcine pulmonary surfactant, PPS)后,肺挫伤的炎症反应得到明显抑制,说明肺表面活性物质有抑制炎症反应的作用^[1]。但有关肺表面活性物质对AM功能影响的报道不一,为此,我们

设计了本实验来探讨PPS对AM功能的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物和试剂 健康SD大鼠10只,体质量(230±10)g,购自第二军医大学实验动物中心;PPS由第二军医大学基础部病理生理学教研室研制,已获得临床试验批准(批准文号:2003L01685)。白假丝酵母菌菌株由第二军医大学长征医院皮肤科惠

[收稿日期] 2012-03-21 **[接受日期]** 2012-06-27**[作者简介]** 刘军强,博士,主治医师,现工作于北京海军总医院胸外科。E-mail: junqiangliu2004@126.com.

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81885707, E-mail: xu_zhi_fei@yahoo.com.cn

赠, RPMI 1640 培养液、小牛血清、RevertAid 反转录合成试剂盒购自美国 Sigma 公司; 脂多糖(LPS)、锥虫蓝染料、Geimsa 染料均购自深圳晶美生物工程有限公司。总 RNA 抽提试剂盒 (Trizol Reagent System) 购自 Invitrogen 公司, Real time PCR 仪 (Eppendorf 公司)。Taq DNA 聚合酶购自日本 TaKaRa 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 模型制作与细胞获得 大鼠肺挫伤模型的制作方法同文献[1]。肺挫伤模型建立成功后半小时内解剖动物, 取肺行支气管肺泡灌洗。所得灌洗液以 1 000 rpm 离心 10 min (离心半径 13.5 cm), PBS 洗涤 2 次, 将沉淀细胞用培养液重悬, 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 2 h, PBS 洗去未贴壁的细胞, 得到实验用 AM, 调整细胞密度为 10⁶/ml。用锥虫蓝染色检测细胞活性, Geimsa 染色检测细胞纯度。

1.2.2 细胞处理 将细胞分置于 9 孔板上, 分别以普通培养液、含 PPS (100 μg/ml 或 200 μg/ml) 的培养液, 在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 2 h; 另取 3 份细胞加入 20 μg/ml LPS 后, 将其中 2 份分别加入 PPS 100 μg/ml 或 PPS 200 μg/ml, 于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 2 h。

1.2.3 细胞吞噬功能检测 采用白假丝酵母菌吞噬法测定 AM 的吞噬功能^[2]。油镜下计数 100 个巨噬细胞, 并计数吞噬颗粒和吞噬细胞数, 计算吞噬率 (rate of phagocytic, PR) 和吞噬指数 (index of phagocytic, PI)。PR = 吞噬菌的细胞数/总细胞数; PI = 吞噬颗粒/总细胞数。

1.2.4 细胞分泌功能检测 收集细胞后, 用 TRIzol 法提取总 RNA, 采用 RT-PCR 法测定各组细胞中 TNF-α mRNA 含量。参考文献[3]设计 TNF-α mRNA 引物, 上游引物 5'-CCC AGA CCC TCA CAC TCA GAT CAT-3', 下游引物 5'-GCA GCC TTG TCC CTT GAA GAG AA-3', 扩增长度 295 bp; 内参照 GAPDH 上游引物 5'-TGA AGG TCG GTG TCA ACG GAT TTG GC-3', 下游引物 5'-CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC-3', 扩增长度 983 bp。反应条件: 94℃ 5 min; 94℃ 15 s, 55℃ 20 s, 72℃ 15 s, 共 38 个循环; 然后 72℃ 10 min。各片段的退火温度稍有差别: TNF-α 是 55℃, GAPDH 是 57℃。所有引物均由上海生工生物工程服务有限公司合成。取 PCR 产物 10 μl 于 1.5% 琼脂糖凝胶中进行电泳检测。将电泳结果行计算机扫描并摄影, 用复日 Smart View2001 软件进行条带光密度定量分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 10.0 统计软件进行分析, 实验结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间均数比较采

用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 两两比较采用 LSD 法或 Dunnett's T3 法。两组均数比较采用独立样本 *t* 检验。检验水平 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 细胞纯度和活性 采用贴壁法成功分离出较纯的 AM, 锥虫蓝染色提示细胞活性 > 90%, Giemsa 染色提示细胞纯度 > 90%。

2.2 细胞 PR 和 PI 的变化

2.2.1 PPS 单独作用对细胞 PR 和 PI 的影响 用 PPS 处理后, AM 的 PR 和 PI 较空白对照组没有明显变化, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 1)。

表 1 PPS 对肺泡巨噬细胞吞噬率和吞噬指数的影响

Tab 1 Effect of PPS on phagocytic rate and phagocytic index of macrophages in each group

<i>n</i> = 10, $\bar{x} \pm s$		
Group	Phagocytic rate	Phagocytic index
Control	9.88 ± 2.1	17.13 ± 2.53
PPS100	10.75 ± 2.06	20 ± 4.37
PPS200	11.75 ± 3.49	21.50 ± 4.69

PPS100, PPS200: Porcine pulmonary surfactant 100 or 200 μg/ml

2.2.2 PPS 对经 LPS 刺激后细胞 PR 和 PI 的影响 结果显示, 与空白对照组相比, LPS 刺激后细胞 PR 和 PI 明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 但加入 PPS 后, 与 LPS 组相比, 细胞的 PR 和 PI 变化不明显, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 2)。

表 2 PPS 对经 LPS 刺激后肺泡巨噬细胞吞噬率和吞噬指数的影响

Tab 2 Effect of PPS on phagocytic rate and phagocytic index of macrophages stimulated with LPS

<i>n</i> = 10, $\bar{x} \pm s$		
Group	Phagocytic rate	Phagocytic index
Control	9.88 ± 2.1	17.13 ± 2.53
LPS	18.13 ± 3.04*	35.50 ± 6.35*
LPS+PPS100	19.63 ± 5.01*	36.13 ± 5.38*
LPS+PPS200	21.38 ± 4.37*	36.25 ± 4.98*

LPS: Lipopoly saccharide (20 μg/ml); PPS100, PPS200: Porcine pulmonary surfactant 100 or 200 μg/ml. * $P < 0.05$ vs control group

2.3 PPS 对细胞中 TNF-α mRNA 含量的影响 PPS 单独作用对细胞 TNF-α mRNA 表达无明显影响, 与空白对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 1)。经 LPS 刺激后细胞 TNF-α mRNA 含量明显升高, 加入 PPS 后, 可明显降低细胞中 TNF-

α mRNA 含量 ($P < 0.05$, 图 2)。

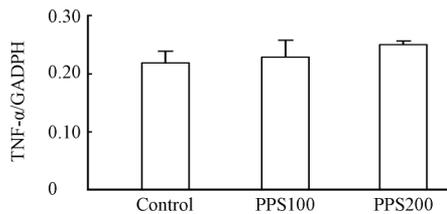


图 1 单纯 PPS 作用后巨噬细胞中 TNF- α mRNA 含量

Fig 1 Level of TNF- α mRNA in macrophages stimulated with PPS alone

PPS100, PPS200: Porcine pulmonary surfactant 100 or 200 $\mu\text{g/ml}$.

$n = 10, \bar{x} \pm s$

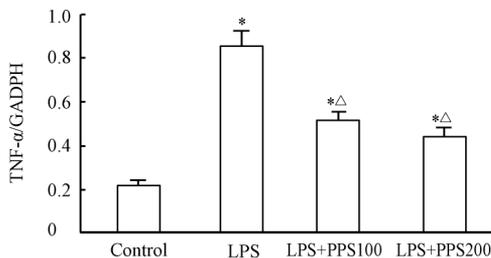


图 2 PPS 对经 LPS 刺激后巨噬细胞中 TNF- α mRNA 含量的影响

Fig 2 Effect of PPS on TNF- α mRNA expression in macrophages stimulated with LPS

LPS: Lipopoly saccharide (20 $\mu\text{g/ml}$); PPS100, PPS200: Porcine pulmonary surfactant 100 or 200 $\mu\text{g/ml}$. * $P < 0.05$ vs control;

$\Delta P < 0.05$ vs LPS. $n = 10, \bar{x} \pm s$

3 讨论

AM 是一种多功能的间质细胞,广泛分布于肺泡内及支气管表面。AM 的活化是肺挫伤后进一步损伤的主要原因,我们的早期研究发现在肺挫伤发生早期采用气道滴入的方法补充 PPS 后,肺挫伤病情得到明显好转,主要表现在肺部的炎症减轻,肺水肿程度缓解,肺功能好转^[1]。本研究进一步分析补充 PPS 对肺挫伤大鼠的治疗作用与 AM 之间的关系。

作为巨噬细胞的非特异性炎症反应,吞噬功能在肺挫伤后的炎症反应中发挥着重要作用。本研究结果发现,经 PPS 单独作用后 AM 的 PR 及 PI 与空白对照组比较并没有明显增高,表明 PPS 单独作用时对 AM 的吞噬作用没有明显影响。但经 LPS 刺激后,AM 的 PI 和 PR 都明显提高,表明其吞噬功能加强,说明 LPS 可以增强巨噬细胞的吞噬功能。在含有 LPS 的巨噬细胞中加入 PPS 后,细胞的 PI 和 PR 与 LPS 组相比有所下降,但差异无统计学意义。受激活后的肺内巨噬细胞是机体防御反应的第一道防线,其趋化、吞噬在启动和诱导免疫反应过程中起着承上启下的关键作用,但本研究结果显示 PPS

并没有影响到巨噬细胞的吞噬作用。

肺挫伤发生后的肺部炎症反应中巨噬细胞的分泌功能发挥着重要作用;在外来刺激激活 AM 后释放 TNF- α , TNF- α 进而作为刺激原刺激其他炎细胞^[3-4],发生级联效应。我们前期的动物实验中发现肺挫伤早期经气道补充 PPS 可以降低支气管肺泡灌洗液中 TNF- α 和血清中 IL-6 的浓度,表明 PPS 对肺挫伤后的炎症反应有抑制作用^[1]。本研究结果显示,PPS 单独作用对 AM 的 TNF- α mRNA 表达无明显影响,但可以明显降低 LPS 刺激后细胞 TNF- α mRNA 的水平,表明 PPS 对 LPS 刺激造成的促炎细胞因子的分泌有抑制作用,其抗炎作用可能与 PPS 的磷脂成分有关^[5-7]。

AM 是炎性细胞因子的主要来源,是急性肺损伤病理过程中的主要效应细胞,正是其功能的多样性为我们治疗肺挫伤提供了新的思路。本实验结果表明 PPS 对活化的巨噬细胞发挥抗炎作用,其作用至少表现在可以抑制巨噬细胞分泌促炎细胞因子 TNF- α ,因此使用 PPS 更利于炎症反应的控制,利于肺损伤的治疗。由于 PPS 单独作用不影响巨噬细胞的功能,因此我们相信经气道补充外源性 PPS 安全、有效,有望作为治疗严重肺挫伤的有效手段在实际工作中加以应用。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 刘军强,卢建,潘铁钟,钟纪根,孙瑜,徐志飞.早期补充肺表面活性物质对肺挫伤的治疗作用[J].中华创伤杂志,2008,24:200-203.
- [2] 黄坚,覃华丽,黄显凯,周继红. CRH 对大鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响[J]. 创伤外科杂志,2006,8:59-62.
- [3] Numata M, Chu H W, Dakhama A, Voelker D R. Pulmonary surfactant phosphatidylglycerol inhibits respiratory syncytial virus-induced inflammation and infection[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107: 320-325.
- [4] Monick M M, Hunninghake G W. Activation of second messenger pathways in alveolar macrophages by endotoxin[J]. Eur Respir J, 2002, 20: 210-222.
- [5] Haddad el-B, McCluskie K, Birrell M A, Dabrowski D, Pecoraro M, Underwood S, et al. Differential effects of ebselen on neutrophil recruitment, chemokine, and inflammatory mediator expression in a rat model of lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation[J]. J Immunol, 2002, 169: 974-982.
- [6] Guo R F, Ward P A. Mediators and regulation of neutrophil accumulation in inflammatory responses in lung: insights from the IgG immune complex model[J]. Free Radic Biol Med, 2002, 33: 303-310.
- [7] Erpenbeck V J, Fischer I, Wiese K, Schaumann F, Schmiedl A, Nassenstein C, et al. Therapeutic surfactants modulate the viability of eosinophils and induce inflammatory mediator release [J]. Int Arch Allergy Immunol, 2009, 149: 333-342.

[本文编辑] 魏学丽,孙岩