

中性粒细胞活化在呼吸机所致肺损伤中的作用

张新日 杜永成 姜宏英 许建英 徐永健

【摘要】 目的 探讨中性粒细胞活化在呼吸机所致肺损伤中的作用。**方法** 32 只 Wistar 大鼠随机分为对照组、小潮气量组、常规潮气量组和大潮气量组。分别测定支气管肺泡灌洗液(BALF)中白细胞及中性粒细胞计数,血浆和 BALF 中蛋白含量及髓过氧化物酶(MPO)活性。**结果** 常规潮气量组和大潮气量组大鼠 BALF 中白细胞及中性粒细胞计数、BALF 中 MPO 活性和蛋白含量均明显高于对照组和小潮气量组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),大潮气量组大鼠 BALF 中 MPO 活性和蛋白含量均明显高于常规潮气量组(P 均 < 0.01),对照组和小潮气量组间比较差异均无显著性(P 均 > 0.05)。各组大鼠间血浆 MPO 活性和蛋白含量比较差异均无显著性(P 均 > 0.05)。**结论** 中性粒细胞募集和活化在呼吸机所致肺损伤中起着重要作用, BALF 中 MPO 活性是反映中性粒细胞活化程度的可靠指标, BALF 中蛋白含量测定对评价肺损伤程度有实用价值。

【关键词】 呼吸机所致肺损伤; 中性粒细胞; 髓过氧化物酶; 支气管肺泡灌洗液

Role of neutrophil activation in ventilator induced lung injury ZHANG Xin-ri*, DU Yong-cheng, JIANG Hong-ying, XU Jian-ying, XU Yong-jian. * Department of Respiratory Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong Science and Technology University, Wuhan 430030, Hubei, China (ZHANG Xin-ri works in First Hospital, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi, China)

【Abstract】 Objective To probe further the role of neutrophil activation in the lung injury induced by mechanical ventilation. **Methods** Thirty-two normal Wistar rats were randomly divided into four groups: control group, low tidal volume group, conventional tidal volume group, and high tidal volume group. The counts of white blood cell (WBC) and neutrophil in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were carried out. The levels of protein and myeloperoxidase (MPO) activity in plasma and BALF were determined by biochemical methods respectively. **Results** The numbers of WBC and neutrophils, and the levels of protein and MPO activity in BALF were significantly increased in normal and high tidal volume groups than those in control and low tidal volume groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$, respectively). The levels of protein and MPO activity in BALF in high tidal volume group were markedly higher compared with normal tidal volume group (both $P < 0.01$), but no statistical differences existed between the low tidal volume group and the control group (both $P > 0.05$). There were no significant differences in the levels of protein and MPO activity in plasma among the four groups ($P > 0.05$). **Conclusion** The recruitment and activation of neutrophils might play an important role in pathogenesis of the biotrauma induced by mechanical ventilation. MPO activity in BALF is a credible index in reflecting the activation of neutrophils. Measuring the level of protein in BALF is valuable to evaluate the extent of lung injury induced by mechanical ventilation.

【Key words】 ventilator induced lung injury; neutrophil; myeloperoxidase; bronchoalveolar lavage fluid

呼吸机相关性肺损伤(ventilator induced lung injury, VILI)的发病机制非常复杂,其中生物伤是近年来研究的热点问题,它是指机械通气时通过炎性细胞和炎症介质诱发或加重肺损伤的过程,然而其临床意义和重要性还远未阐明^[1-3]。本研究中通过测定不同潮气量机械通气大鼠支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中白细胞

(WBC)和中性粒细胞计数,血浆和 BALF 中髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)活性及蛋白含量,探讨中性粒细胞活化在 VILI 中的作用。

1 材料与方法

1.1 动物与分组:健康雄性 Wistar 大鼠 32 只(山西医科大学动物中心提供),体重 300~310 g,随机分为 4 组,每组 8 只。①对照组:不行机械通气;②小潮气量组:呼吸机潮气量 7 ml/kg;③常规潮气量组:潮气量 12 ml/kg;④大潮气量组:潮气量 40 ml/kg。

1.2 通气方法:腹腔注射质量分数为 25%的乌拉坦(4 ml/kg)麻醉大鼠后行气管切开。除对照组外,其余各组大鼠均通过胶管与动物人工呼吸机(浙江大学医学仪器厂制造)连接行机械通气。各组大鼠的

基金项目:山西省自然科学基金资助项目(20041112)

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院呼吸科[张新日(现在山西医科大学第一医院呼吸科 030001),徐永健];030001 太原,山西医科大学第一医院呼吸科(杜永成,姜宏英,许建英)

作者简介:张新日(1961-),男(汉族),山西省大同市人,博士研究生,主任医师,主要从事机械通气基础与临床应用研究。

通气参数除潮气量外,其余参数均相同,即呼吸频率 60 次/min,吸:呼为 1:3,吸入氧浓度(FiO_2)0.21。通气时间均为 1 h。

1.3 检测指标及方法:通气结束后,腹主动脉取血 2~3 ml,肝素钠抗凝,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液,-30℃冻存待测。取左肺行支气管肺泡灌洗术(4 ml×4 次),回收量不少于 80%,BALF 经单层纱布过滤,静置 10 min 待检。取 1 ml 行瑞氏染色,光镜下行 WBC 和中性粒细胞计数;剩余 BALF 经 3 000 r/min 离心 10 min,取上清,-30℃冻存。按文献[4]介绍的方法测定血浆和 BALF 中 MPO 活性,以酶活力单位(U)表示,每克组织蛋白在 37℃的反应体系中分解 1 μmol H_2O_2 为 1 U;用考马斯亮蓝法测定血浆蛋白含量;用双缩脲法测定 BALF 蛋白含量。MPO 及蛋白含量测定试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。

1.4 统计学处理:数据用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,用单因素方差分析,各组均数间两两比较用 q 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠 BALF 中 WBC 及中性粒细胞计数(表 1):常规潮气量组和大潮气量组大鼠 BALF 中 WBC 及中性粒细胞计数均明显高于对照组和小潮气量组(P 均 <0.01),对照组和小潮气量组间比较差异均无显著性(P 均 >0.05)。

表 1 各组 BALF 中 WBC 及中性粒细胞计数比较($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 1 Comparison of WBC and neutrophil counts in BALF in each groups($\bar{x}\pm s, n=8$) $\times 10^6/\text{L}$

组别	WBC	中性粒细胞
对照组	160.82±3.70	0.09±0.03
小潮气量组	171.30±4.50	0.10±0.03
常规潮气量组	801.33±3.70** $\Delta\Delta$	11.80±0.04** $\Delta\Delta$
大潮气量组	875.10±4.10** $\Delta\Delta$	12.51±0.05** $\Delta\Delta$

注:与对照组比较:** $P<0.01$;与小潮气量组比较: $\Delta\Delta P<0.01$

2.2 各组大鼠血浆及 BALF 中 MPO 活性(表 2):常规潮气量组和大潮气量组大鼠 BALF 中 MPO 活性均明显高于对照组和小潮气量组($P<0.01$ 或 $P<0.05$),大潮气量组大鼠 BALF 中 MPO 活性明显高于常规潮气量组($P<0.01$),对照组和小潮气量组比较差异无显著性($P>0.05$)。各组大鼠血浆 MPO 活性比较差异均无显著性(P 均 >0.05)。

2.3 各组大鼠血浆及 BALF 中蛋白含量(表 3):常规潮气量组和大潮气量组大鼠 BALF 中蛋白含量均明显高于对照组和小潮气量组(P 均 <0.01),大潮气量组大鼠 BALF 中蛋白含量明显高于常规潮

气量组($P<0.01$),对照组和小潮气量组间比较差异无显著性($P>0.05$)。各组大鼠间血浆蛋白含量比较差异均无显著性(P 均 >0.05)。

表 2 各组血浆及 BALF 中 MPO 活性比较($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 2 Comparison of MPO activities in plasma and BALF in each group($\bar{x}\pm s, n=8$) U/L

组别	血浆中 MPO	BALF 中 MPO
对照组	45.56±3.15	23.30±5.31
小潮气量组	48.04±5.45	24.30±6.23
常规潮气量组	48.52±1.72	33.31±6.38* Δ
大潮气量组	49.99±5.98	49.04±15.75** $\Delta\Delta\Delta\Delta$

注:与对照组比较:** $P<0.05$,** $P<0.01$;与小潮气量组比较: $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$;与常规潮气量组比较: $\Delta\Delta P<0.01$

表 3 各组血浆及 BALF 中蛋白含量比较($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 3 Comparison of protein levels in plasma and BALF in each group($\bar{x}\pm s, n=8$) g/L

组别	血浆蛋白含量	BALF 蛋白含量
对照组	26.62±6.04	0.19±0.02
小潮气量组	28.65±4.31	0.18±0.02
常规潮气量组	29.35±3.68	0.40±0.03** $\Delta\Delta$
大潮气量组	29.78±6.45	0.57±0.03** $\Delta\Delta\Delta\Delta$

注:与对照组比较:** $P<0.01$;与小潮气量组比较:

$\Delta\Delta P<0.01$;与常规潮气量组比较: $\Delta\Delta\Delta P<0.01$

3 讨论

目前认为,VILI 可分为气压伤、容积伤、不张伤和生物伤 4 种类型。前 3 者是由通气压力过高、潮气量过大以及肺泡周期性开闭形成剪切力而引起的肺损伤,是一种严重、直观的机械性损伤;而生物伤是由肺泡内炎症细胞募集、活化并释放炎症介质和细胞因子引起的肺损伤,是一种微观、无形肺损伤^[5]。

在参与机体炎症反应的众多炎症细胞中,中性粒细胞是数量最大、功能最强的细胞,具有很强的趋化、变形、黏附、吞噬和杀菌作用。中性粒细胞不但在感染性炎症中起重要作用,在机械性、创伤性、理化性炎症反应中也扮演着重要角色,它在杀伤病原微生物的同时,对正常组织细胞也有一定的破坏作用。研究表明,中性粒细胞在肺内募集、活化并释放炎症介质和蛋白水解酶是引起呼吸机所致肺生物伤的主要原因。Tsunno 等^[6]用 30 ml/kg 的潮气量给猪进行机械通气,4 h 后发现肺泡毛细血管周围有中性粒细胞聚集,并有肺间质水肿;22 h 后发现肺间质和肺泡腔内有大量中性粒细胞和巨噬细胞浸润。Kawano 等^[7]事先用氮芥给动物造成粒细胞缺乏症后再进行机械通气,结果发现实验组动物肺损伤程度比对照组明显减轻。为了研究中性粒细胞在急性肺损伤(ALI)中的作用,Abraham 等^[8]用环磷酰胺

和抗中性粒细胞抗体进行预处理,以清除和抑制小鼠体内的中性粒细胞,然后再建立失血性和内毒素性 ALI 模型,与未经环磷酰胺和抗中性粒细胞抗体预处理的 ALI 模型进行比较发现,经预处理的 ALI 小鼠肺间质水肿明显减轻,体内与中性粒细胞相关的炎症因子,如白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-8、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)及巨噬细胞炎症蛋白-2(MIP-2)mRNA 及其蛋白表达均明显下降。

MPO 是中性粒细胞嗜天青颗粒释放的过氧化物酶类,为一种血红素蛋白,催化 H₂O₂ 与氯起化学反应,产生次氯酸,后者具有很强的抗微生物活性,但对正常组织细胞也有损伤作用。Bradley 等^[9]研究表明,MPO 水平与中性粒细胞数之间存在极显著相关性,可作为中性粒细胞的活性标志。本研究显示,常规潮气量组和大潮气量组大鼠 BALF 中 WBC 及中性粒细胞计数、BALF 中 MPO 活性及蛋白含量均明显高于对照组和小潮气量组,表明中性粒细胞在肺内募集、活化在呼吸机所致肺生物伤中起重要作用,且潮气量越大,中性粒细胞数目越多、活性越高,肺组织损伤越重。各组大鼠血浆 MPO 活性及蛋白含量比较差异无显著性,说明 VILI 在一定程度上主要表现在肺脏局部,而对全身影响较小。

中性粒细胞诱发 ALI 的机制尚不完全清楚,至少可通过释放蛋白酶和释放超氧化物两条途径直接引发肺损伤。与 ALI 有关的蛋白酶主要有弹力酶(elastase)和胶原酶(collagenase)。中性粒细胞在其炎症介质诱导下由血管内向肺泡腔迁移过程中释放大量弹力酶和胶原酶,这些蛋白酶可直接损伤肺泡上皮和血管内皮细胞。同时,中性粒细胞还可释放大量的过氧化物,后者通过脂质过氧化作用导致脂肪酸链断裂,影响膜的流动性和通透性,并促进血栓素 A₂(TXA₂)、前列腺素 E(PGE)和白三烯 C₄ 的生

成,加重肺内炎症反应;此外,过氧化物与蛋白质中的甲硫氨酸、半胱氨酸及酪氨酸残基直接反应,可破坏蛋白结构,影响酶的活性,还可引起肺泡上皮细胞 DNA 链断裂,加重肺损伤^[10]。肺泡上皮和血管内皮细胞受损,通透性增高,使血浆及蛋白成分外渗,引起肺间质和肺泡水肿,严重者可致小血管破裂,肺泡腔出血。因此,测定血浆及 BALF 中蛋白含量,并计算肺泡膜通透指数(血浆蛋白含量/BALF 中蛋白含量比值)在某种程度上可反映肺组织损伤程度,而且测定方法简单可靠,有一定实用价值。

参考文献:

- 1 Tremblay L N, Slutsky A S. Ventilator-induced injury: from barotrauma to biotrauma[J]. Proc Assoc Am Physicians, 1998, 110:482-488.
- 2 Slutsky A S. Lung injury caused by mechanical ventilation[J]. Chest, 1999, 116:9S-15S.
- 3 张劲夫. 机械通气相关肺损伤与肺保护性通气策略[J]. 中国危重病急救医学, 2001, 13:76-78.
- 4 罗武生, 郭兆贵. MPO 法测定心肌组织中的中性粒细胞[J]. 中国药理学通报, 1990, 6:264-269.
- 5 张新日, 徐永健. 机械通气所致肺损伤的概念和发生机制[J]. 国外医学呼吸系统分册, 2004, 24:119-121.
- 6 Tsuno K, Miura K, Takeya M, et al. Histopathologic pulmonary changes from mechanical ventilation at high peak airway pressures[J]. Am Rev Respir Dis, 1991, 143:1115-1120.
- 7 Kawano T, Mori S, Cybulsky M, et al. Effect of granulocyte depletion in a ventilated surfactant-depleted lung[J]. J Appl Physiol, 1987, 62:27-33.
- 8 Abraham E, Kaneko D J, Shenkar R. Effects of endogenous and exogenous catecholamines on LPS-induced neutrophil trafficking and activation[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 1999, 276:L1-L8.
- 9 Bradley P P, Priebe D A, Christensen R D, et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker[J]. J Invest Dermatol, 1982, 78:206-209.
- 10 阎锡新, 郭丽萍. 中性粒细胞在急性肺损伤中的作用[J]. 国外医学呼吸系统分册, 2002, 22:194-196.

(收稿日期:2004-12-02 修回日期:2005-05-25)

(本文编辑:郭方)

• 启事 •

机械通气学习班消息

解放军总医院(三〇一医院)南楼呼吸科应用机械通气救治严重呼吸衰竭已有 20 多年的历史,抢救患者数千例次,成功率达国内外先进水平。科内拥有 Simens900C、300A、servi、PB840、7200、760、740、珈利略及 Evita4、EvitaXL 等各种品牌的呼吸机 50 余台,平均每天有 40 余台呼吸机应用于患者。近年已连续举办 4 届全国机械通气学习班,受到众多专业人士的好评。今年我们与西门子中国公司合作将于 2005 年 9 月下旬在北京联合举办“第五届全国机械通气临床应用学习班”,该项目为国家继续教育项目(编号:国字 04-02-033)。学习班仍由俞森洋教授主讲,邀请国内知名呼吸病专家罗慰慈、王辰、刘又宁、蔡柏蔷、林江涛、孙铁英等教授参与授课。课程内容丰富、形式多样,理论与实践并重。欢迎全国各地的专业人士报名参加。

报名地址:北京市复兴路 28 号 解放军总医院南楼呼吸科 邮编:100853。联系人:张晓军,李文兵,高德伟。电话:010-66939623,66937674。BP:010-66939115 呼张晓军,李文兵或高德伟。Email:zhangxiaojun301@sina.com 或 gaodw301@sina.com。

(解放军总医院)